



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE ANATOMÍA, HISTOLOGÍA
Y NEUROCIENCIA



REGULACIÓN POR LA OVARIECTOMÍA, LA SÍNTESIS LOCAL DE
ESTRADIOL Y LA TERAPIA HORMONAL, DEL ESTADO DE
ACTIVACIÓN DE QUINASAS IMPLICADAS EN SEÑALIZACIÓN
INTRACELULAR, EN EL CEREBRO DE RATA

Memoria para optar al grado de Doctor en Neurociencia que presenta

AMAYA SANZ RODRÍGUEZ

Realizada en el Instituto Cajal (CSIC) bajo la dirección
del Dr Luis Miguel García Segura

Vº Bueno del Director

Vº Bueno del Tutor

Luis Miguel García Segura

Carlos Avendaño Trueba

La interesada

Amaya Sanz Rodríguez

Madrid 2009

Luis Miguel García Segura. Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor de Investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

CERTIFICA:

Que Dña. Amaya Sanz Rodríguez. Licenciada en Bioquímica por la Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo mi dirección el trabajo que lleva por título:

“Regulación por la ovariectomía, la síntesis local de estradiol y la terapia hormonal, del estado de activación de quinasas implicadas en señalización intracelular, en el cerebro de rata”

Considero que este trabajo es satisfactorio y apto para su presentación como Tesis Doctoral en el Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que así conste, expido el presente certificado en Madrid, a 5 de Marzo de 2009.

Fdo. Luis Miguel García Segura
Profesor de Investigación CSIC

Este trabajo ha sido realizado con cargo a proyectos del Ministerio de Educación y Ciencia (SAF 2005-00272) y de la Unión Europea (proyecto EWA LSHM-CT-2005-518245).

Amaya Sanz Rodríguez ha recibido financiación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, dentro del Programa de Itinerario Integrado de Inserción Profesional (I3P/2005).

ÍNDICE

RESUMEN.....	5
ABREVIATURAS	7
INTRODUCCIÓN	9
1. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ESTRADIOL.....	11
2. SÍNTESIS DEL ESTRADIOL.	12
2.1 SÍNTESIS EN EL OVARIO.....	13
2.2 SÍNTESIS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.	14
3. FUNCIONES DEL ESTRADIOL EN EL CEREBRO.	15
3.1 DESARROLLO CEREBRAL.....	15
3.1.1 Estado embrionario.....	15
3.1.2 Pubertad.	17
3.2 NEUROPROTECCIÓN.....	19
3.4 TERAPIA HORMONAL SUSTITUTIVA.	22
4. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ESTRADIOL.	23
4.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ESTRADIOL INICIADOS EN EL NÚCLEO.	24
4.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ESTRADIOL INICIADOS EN LA MEMBRANA.....	26
4.3 RECEPTORES DE ESTRÓGENO.....	28
5. INTERACCIÓN CON FACTORES TRÓFICOS.....	30
OBJETIVOS.....	33
OBJETIVO GENERAL.....	35
OBJETIVOS CONCRETOS.	35
MATERIALES Y MÉTODOS	37
1. MODELOS DE ESTUDIO.....	39
1.1 MODELO <i>IN VIVO</i> : RATAS WISTAR.....	39
- Ovariectomía (OVX)	39
- Tratamiento.....	39
- Sacrificio	39
1.2 MODELO <i>IN VITRO</i> : CULTIVOS PRIMARIOS.	40

ÍNDICE

1.2.1	Astrocitos de corteza o hipocampo.....	40
1.2.2	Neuronas de corteza.....	40
2.	TECNICAS UTILIZADAS.....	41
2.1	OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS	41
-	De tejido.....	41
-	De cultivos celulares.....	41
2.2	ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOTTING	42
2.3	INMUNOHISTOQUÍMICA.....	43
2.4	ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	45
2.5	INMUNOCITOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA	45
2.6	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	46
3.	DISEÑO EXPERIMENTAL	47
3.1	EXPERIMENTOS <i>IN VIVO</i>	47
3.1.1	Estudio del efecto de la ausencia de hormonas gonadales, debido a la ovariectomía, sobre las vías de señalización de la PI3K y las MAPKs en cerebro de ratas hembra.....	47
3.1.2	Estudio del efecto de la madurez sexual en la capacidad del estradiol de activar las vías de señalización de la PI3K y las MAPKs en corteza prefrontal de ratas hembra.....	48
3.1.3	Expresión de los receptores de IGF-I y estrógenos en el cerebro de rata, en relación a la edad, la ovariectomía y el tratamiento con estradiol	49
3.2	EXPERIMENTOS <i>IN VITRO</i>	50
3.2.1	Diseño experimental para astrocitos.....	51
3.2.2	Diseño experimental para neuronas	52
	RESULTADOS.....	55
1	EFFECTO DE LA AUSENCIA DE HORMONAS GONADALES, DEBIDO A LA OVARIECTOMÍA, SOBRE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA PI3K Y DE LAS MAPKS EN EL CEREBRO DE RATA HEMBRA	57
1.1	EFFECTO DEL PASO DEL TIEMPO TRAS LA OVARIECTOMÍA.	57
1.1.1	Vía de la PI3K.....	57
1.1.2	Vía de las MAPKs.....	59
1.1.3	Receptores de IGF-I y de estradiol	61
1.2	INTERACCIÓN DE LA EDAD DE OVARIECTOMÍA, CON EL PASO DEL TIEMPO TRAS LA MISMA	63

1.2.1 Vía de la PI3K.....	63
1.2.2 Vía de las MAPKs.....	65
1.2.3 Receptores de IGF-I y de estradiol.....	67
 2 EFECTO DE LA MADUREZ SEXUAL EN LA CAPACIDAD DEL ESTRADIOL DE ACTIVAR LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA PI3K Y DE LAS MAPKS EN CORTEZA PREFRONTAL DE RATA.....	 69
2.1 VÍA DE LA PI3K.....	69
2.2 RECEPTORES DE IGF-I Y DE ESTRADIOL.....	72
 3 EFECTO DE LA EDAD, LA OVARECTOMÍA Y EL TRATAMIENTO CON ESTRADIOL EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE IGF-I Y DE ESTRÓGENO EN CEREBRO DE RATA.....	 77
3.1 EFECTO DEL TIEMPO DE OVARECTOMÍA.....	77
3.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ESTRADIOL.....	79
3.3 EFECTO DE LA EDAD.....	81
 4. EFECTO DE LA ACTIVIDAD AROMATASA Y DEL ESTRADIOL EXÓGENO SOBRE LAS VÍAS DE LA PI3K Y DE LAS MAPKS EN ASTROCITOS O NEURONAS.....	 83
4.1 ASTROCITOS DE CORTEZA TOTAL.....	86
4.1.1 Vía de la PI3K.....	86
4.1.2 Vía de las MAPKs.....	88
4.2 ASTROCITOS DE HIPOCAMPO.....	90
4.2.1 Vía de la PI3K.....	91
4.2.2 Vía de las MAPKs.....	92
4.3 NEURONAS DE CORTEZA TOTAL.....	93
4.3.1 Vía de la PI3K.....	93
4.3.2 Vía de las MAPKs.....	94
 5. ESTUDIO DEL EFECTO DEL IGF-I SOBRE LAS VÍAS DE PI3K Y MAPK EN ASTROCITOS Y NEURONAS Y DE SU INTERACCIÓN CON LA ACTIVIDAD AROMATASA Y EL ESTRADIOL EXÓGENO.....	 96
5.1 ASTROCITOS DE CORTEZA TOTAL.....	96
5.1.1 Vía de la PI3K.....	96
5.1.2 Vía de las MAPKs.....	98
5.2 ASTROCITOS DE HIPOCAMPO.....	101
5.2.1 Vía de la PI3K.....	101

ÍNDICE

5.2.2 Vía de las MAPKs.....	103
5.3 NEURONAS DE CORTEZA TOTAL.....	106
5.3.1 Vía de la PI3K.....	106
5.3.2 Vía de las MAPKs.....	108
5.4 NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO Y DE IGF-I.	111
DISCUSIÓN.....	113
1 EFECTO DE LA AUSENCIA DE HORMONAS GONADALES, DEBIDO A LA OVARECTOMÍA, SOBRE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA PI3K Y DE LAS MAPKS EN EL CEREBRO DE RATA HEMBRA.....	115
2 EFECTO DE LA MADUREZ SEXUAL EN LA CAPACIDAD DEL ESTRADIOL DE ACTIVAR LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA PI3K Y DE LAS MAPKS EN CORTEZA PREFRONTAL DE RATA.....	120
3 EFECTO DE LA EDAD, LA OVARECTOMÍA Y EL TRATAMIENTO CON ESTRADIOL EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE IGF-I Y DE ESTRÓGENO EN CEREBRO DE RATA.....	124
4. EFECTO DE LA ACTIVIDAD AROMATASA Y DEL ESTRADIOL EXÓGENO SOBRE LAS VÍAS DE LA PI3K Y DE LAS MAPKS EN ASTROCITOS O NEURONAS.....	128
5. ESTUDIO DEL EFECTO DEL IGF-I SOBRE LAS VÍAS DE PI3K Y MAPKS EN ASTROCITOS Y NEURONAS Y DE SU INTERACCIÓN CON LA ACTIVIDAD AROMATASA Y EL ESTRADIOL EXÓGENO.....	131
CONCLUSIONES.....	137
BIBLIOGRAFÍA.....	141

RESUMEN

Los estrógenos desarrollan sus funciones en el cerebro a través de mecanismos genómicos y de mecanismos no genómicos que implican la regulación de vías de señalización intracelulares, como son la vía de la fosfatidil inositol 3 quinasa (PI3K) y la de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK). El estrógeno es sintetizado fundamentalmente en las gónadas aunque también hay síntesis en el sistema nervioso y otros tejidos en mamíferos. La etapa limitante en la síntesis de estrógenos corre a cargo de la enzima aromatasa, responsable de la conversión de andrógenos en estrógenos. En esta tesis quisimos estudiar como se modulaba la regulación que ejerce el estradiol sintetizado por el organismo o el aportado exógenamente sobre estas dos vías de señalización intracelular.

Analizamos el efecto que a corto plazo ejerce la privación hormonal causada por la ovariectomía, sobre las vías de la PI3K y de las MAPKs en el cerebro. Parece que la pérdida del aporte de hormonas ováricas en el cerebro produce una disminución en el estado de activación de las vías de señalización estudiadas, que en un proceso de reequilibrio, va restableciéndose con el tiempo. Por otra parte, la ovariectomía puede generar cambios en la capacidad del cerebro de responder al aporte externo de estradiol. De hecho, en la corteza prefrontal, el estradiol pierde la capacidad de activar la vía de la PI3K en animales ovariectomizados antes de la pubertad. Las hormonas ováricas parecen encargarse de programar la corteza prefrontal para responder a una futura regulación del estradiol sobre la vía de la PI3K. Finalmente, teniendo en cuenta la importancia en la activación de las vías de supervivencia por estradiol de los receptores de estrógeno y del receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (IGF-I), estudiamos como se modifica su expresión en el cerebro de rata, en función del tiempo de ovariectomía, del tratamiento con estradiol o de la edad. Los niveles de expresión de los receptores de estrógeno y de IGF-I, a pesar de la interacción funcional que presentan en el cerebro, no responden de la misma manera al tratamiento con estradiol, al envejecimiento o a los cambios ocasionados por la ovariectomía.

En el estudio de cómo la aromatasa endógena expresada por neuronas y astrocitos en cultivo modula la activación de las vías de la PI3K y de las MAPKs, comprobamos que la actividad de la aromatasa endógena regula, de forma específica según el tipo celular, la fosforilación de las quinastas de las vías de la PI3K y de las MAPKs y afecta a la respuesta que estas quinastas tienen a una administración exógena de estradiol. En un último estudio sobre la interacción del estradiol y del IGF-I

RESUMEN

en su regulación de las vías de señalización intracelulares, observamos que la actividad de la aromatasa regula el efecto del IGF-I sólo sobre la vía de las MAPKs y que dicha regulación es exclusiva de astrocitos y dependiente de la región cerebral de la que procedan. En las neuronas de corteza cerebral, aunque el efecto del IGF-I sobre ambas vías no sea dependiente del estradiol, sí que lo es de sus receptores.

En conclusión, la regulación que el estradiol ejerce sobre el estado de activación de las vías de la PI3K y de las MAPKs es dependiente de la procedencia, endocrina, paracrina o exógena del mismo, exhibe especificidad de región cerebral y de tipo celular, se ve afectada por la presencia de factores tróficos y en algunos casos, es una capacidad adquirida durante la pubertad.

ABREVIATURAS

ABC: Complejo avidina biotina
Ab/Am: Antibiótico/antimicótico
AF: Función de activación
AMPc: Adenosín monofosfato cíclico
AP: Proteína activadora
ATF: Factor de activación transcripcional
BDNF: Factor neurotrófico derivado del cerebro
BSA: Albúmina sérica bovina
CREB: Proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc
DAB: Diaminobencidina
DAG: Diacilglicerol
DAPI: Diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol
DBD: Dominio de unión al DNA
DHEA: Dehidroepiandrosterona
DHT: Dihidrotestosterona
DMEM: Dulbecco's modified eagle medium
DMSO: Dimetil sulfóxido
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DTT: Ditiotreitól
ER: Receptor de estrógeno
ERE: Elemento de respuesta a estrógeno
ERK: Quinasa regulada extracelularmente
FBS: Suero fetal de ternera
FSH: Hormona estimulante de folículo
GAP-43: Proteína 43 asociada al crecimiento
GPR30: Receptor acoplado a proteínas G 30
GSK3: Glucógeno sintasa quinasa 3
Hsp: Proteína de choque térmico
I3P: Inositol trifosfato
IGF-I: Factor de crecimiento similar a la insulina tipo I
IGF-IR: Receptor de IGF-I
IRS-1: Sustrato del receptor de insulina tipo 1
LBD: Dominio de unión al ligando
LH: Hormona luteinizante
MAPK: Proteína quinasa activada por mitógenos
MAPKAP-K1: Proteína quinasa 1 activada por MAPK
MAP-2: Proteína asociada a los microtúbulos

ABREVIATURAS

mRNA: Ácido ribonucleico mensajero.

NGF: Factor de crecimiento neuronal

NFκB: Factor nuclear κB

NGS: Suero normal de cabra

NLS: Secuencia de localización nuclear

NT-3: Neurotrofina 3

OVX: Ovariectomía

P: Dias postnatales

PB: Tampón fosfato

PBS: Tampón fosfato salino

PBT-BSA: Tampón fosfato con Tritón X-100 y albúmina sérica bovina

PCNA: Antígeno nuclear de proliferación celular

PDK: Quinasa dependiente de fosfoinosítidos

PFA: Paraformaldehído

PI3K: Fosfatidil inositol 3 kinasa

PKC: Proteína quinasa dependiente de calcio

PMSF: Fenil metil sulfóxido

RSK: Quinasa ribosomal S6

SDS: Dodecilo sulfato sal sódica

SERM: Modulador selectivo de los receptores de estrógeno

TBS: Tampón tris salino

TTBS: Tampón tris salino con Tween 20

INTRODUCCIÓN

1. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL ESTRADIOL.

El estradiol (17 β -estradiol) es el estrógeno natural más potente en seres humanos seguido por la estrona y el estriol. Cada una de estas moléculas es un esteroide de 18 carbonos, que contiene un anillo fenólico A (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3) y un grupo β -hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D (Figura 1).

El estradiol, a excepción de su región terminal, es una molécula apolar e hidrofóbica. La flexibilidad conformacional del esqueleto estratrieno reside en el anillo B (Duax WL y Weeks CM, 1980) probablemente, debido a sus uniones en una conformación de baja energía. El grupo fenólico OH del anillo A presenta una energía libre de unión que le hace actuar fundamentalmente como un enlace donador de hidrógeno. Por su parte, el grupo 17 β -hidroxilo del anillo D presenta una energía libre inferior a la del grupo fenólico del anillo A y suele actuar como un enlace aceptor de hidrógenos, ya sea directamente o a partir de una molécula de agua.

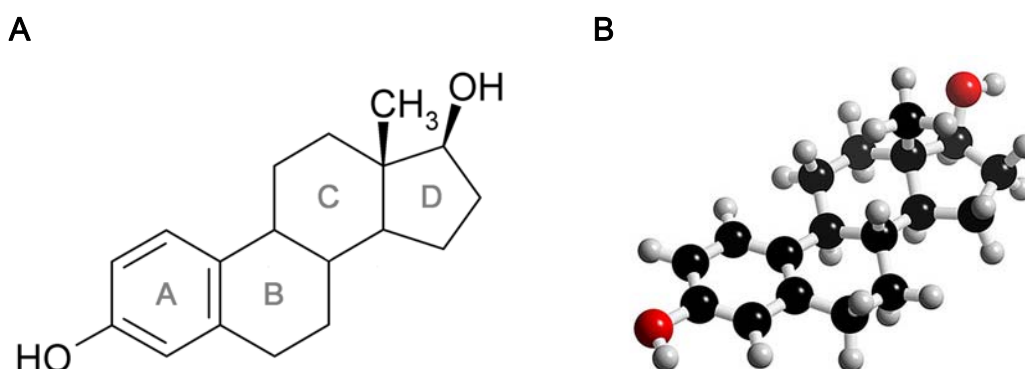


Figura 1. Estructura molecular del 17 β -estradiol. A) Fórmula geométrica de la molécula. B) Estructura tridimensional de la molécula. Los carbonos se representan por una esfera negra, los hidrógenos por una esfera gris claro y los oxígenos por una esfera roja.

El anillo fenólico A es la principal característica estructural del estradiol de la que depende la unión selectiva y de alta afinidad a los receptores de estrógenos (Jordan CV y cols., 1985; Duax WL y cols., 1988). Esto se debe a que, aunque el receptor rodea al ligando de tal manera que los cuatro anillos contribuyen a la unión, el anillo aromático presenta una energía libre relativamente alta al contactar por su cara β con los residuos del receptor y establecer interacciones polares débiles con ellos de tal modo que hace muy estable la unión receptor-ligando.

INTRODUCCIÓN

2. SÍNTESIS DEL ESTRADIOL.

La ruta de síntesis del estradiol al igual que la de los otros esteroides sexuales, parte del colesterol, que tras varias reacciones se convierte en androstenediona. Este andrógeno es convertido en testosterona, que a través de una aromatización se transforma en estradiol. Alternativamente, la androstenediona puede ser aromatizada a estrona, que posteriormente es convertida en estradiol (Figura 2). La aromatasa (estradiol sintetasa) es la enzima que cataliza dichas aromatizaciones y sintetiza diversos estrógenos utilizando como sustrato distintos andrógenos. Así, es capaz de metabolizar la testosterona en estradiol, la androstenediona en estrona y la dehidroepiandrosterona (DHEA) en estriol (Simpson ER y cols., 1994).

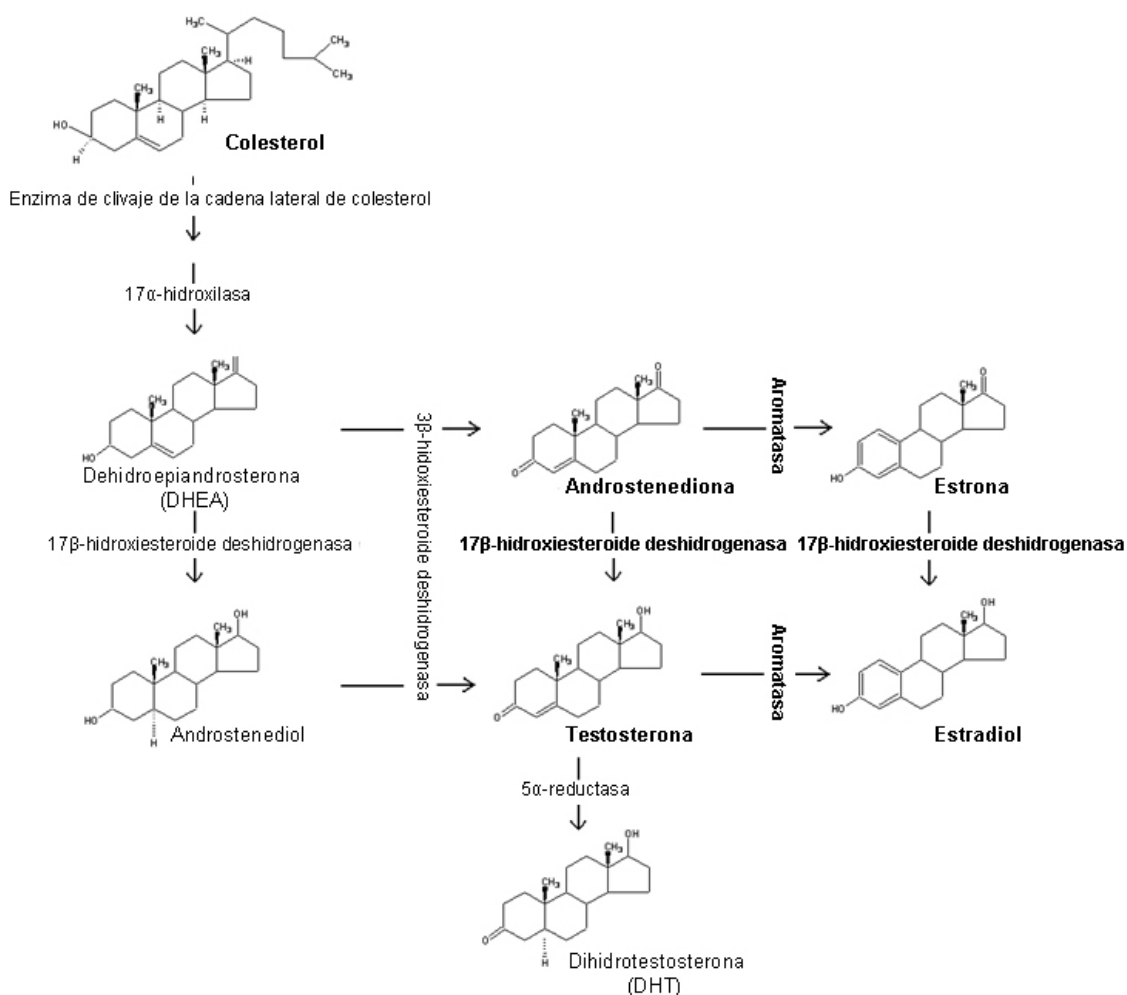


Figura 2. Esquema de la esteroidogénesis con las moléculas que se sintetizan y las enzimas implicadas en el proceso.

2.1 SÍNTESIS EN EL OVARIO.

Las hormonas esteroideas son sintetizadas fundamentalmente en las gónadas, las glándulas suprarrenales y la placenta. La expresión específica de tejido de las diferentes enzimas esteroidogénicas, es la que determina qué esteroides se sintetizan en cada caso, a pesar de que los pasos iniciales de la síntesis de los esteroides, son comunes en todos los tejidos esteroidogénicos.

Durante los años reproductivos, en las mujeres, la mayoría del estradiol es producido por las células granulosas de los ovarios, mientras que una mínima parte de los estrógenos circulantes procede de las glándulas suprarrenales.

El ciclo estral de los mamíferos comprende, la preparación periódica del endometrio para la implantación del embrión; la maduración del óvulo y la ovulación. Estos procesos son regulados por las hormonas que liberan los ovarios: la progesterona y el estradiol (figura 3). Las fluctuaciones, escalonadas en forma precisa en el tiempo, de la producción y secreción de las diversas hormonas, son necesarias para que el ciclo se desarrolle correctamente. Por ello, la hipófisis bajo el control del hipotálamo es la encargada de regular la síntesis de hormonas en el ovario mediante la secreción de la hormona estimulante de folículo (FSH) y la hormona luteinizante (LH). La secreción de estas hormonas fluctúa a lo largo del ciclo estral (figura 4) y es regulada a su vez retrógradamente por las hormonas que secreta el ovario.

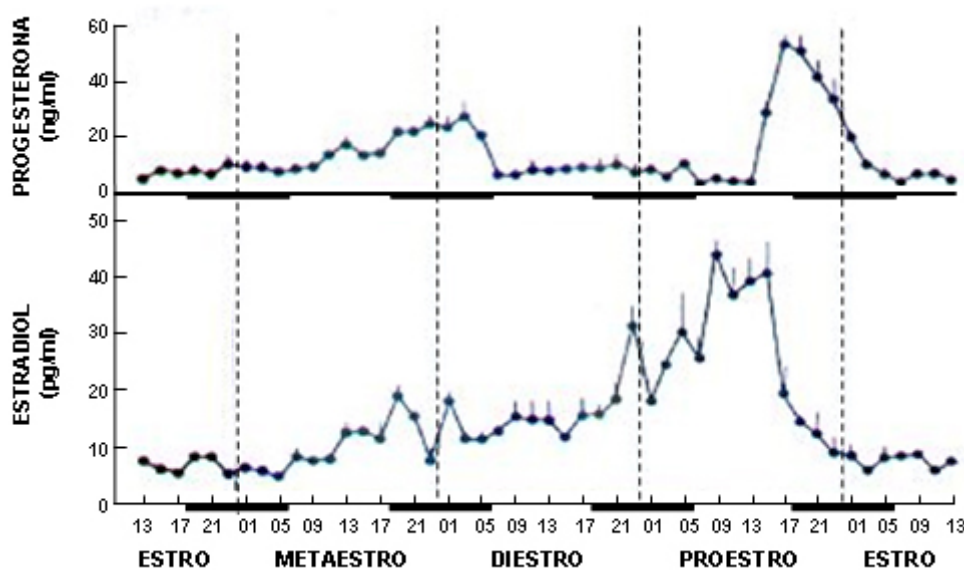


Figura 3. Diagrama de las concentraciones plasmáticas de las hormonas sintetizadas en el ovario, la progesterona y el estradiol, a lo largo del ciclo estral de una rata. Se realizaron cuantificaciones cada 2

INTRODUCCIÓN

horas en las cuatro fases del ciclo. Los periodos de oscuridad se indican con la raya horizontal más gruesa (Smith MS y cols., 1975).

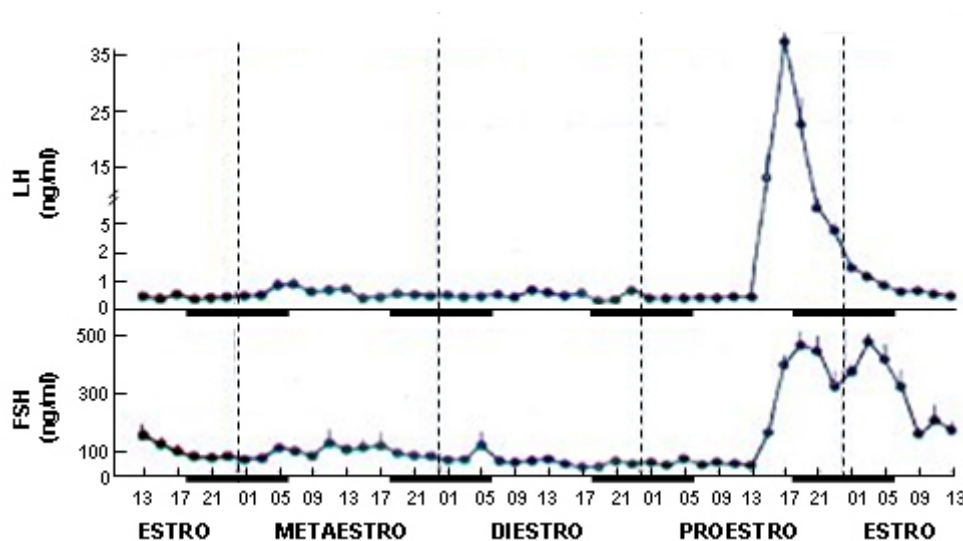


Figura 4. Diagrama de las concentraciones plasmáticas de las gonadotropinas sintetizadas en la hipófisis, la hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante de folículo (FSH), a lo largo del ciclo estral de una rata. Se realizaron cuantificaciones cada 2 horas en las cuatro fases del ciclo. Los periodos de oscuridad se indican con la raya horizontal más gruesa (Smith MS y cols., 1975).

El ciclo estral en la rata hembra es muy corto (4 ó 5 días) y consta de cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro (Figuras 3 ó 4). La duración del proestro es de aproximadamente 12 horas. En el estro, que dura 9-15 horas, el ovario sintetiza estrógenos que actuando en el hipotálamo incrementan la producción de FSH y LH durante los 2 días siguientes. El metaestro dura 21 horas en las que se produce el pico de LH y la consecuente ovulación. El pico de LH determina el final de la producción de estrógenos y el comienzo de la producción de progesterona por los cuerpos lúteos. Finalmente, el diestro dura 57 horas y se caracteriza por que los cuerpos lúteos producen abundante progesterona que desbloquea la producción de FSH y LH, lo que inicia nuevamente el ciclo.

2.2 SÍNTESIS EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

La aromatasa, que cataliza la etapa limitante en la síntesis de estrógenos, se expresa en el sistema nervioso central de vertebrados. La actividad de la aromatasa en el cerebro, fue descrita por primera vez por Naftolin y colaboradores (Naftolin F y cols., 1971a, 1971b, 1972) en el sistema límbico de embriones humanos y en el

hipotálamo de rata. El estudio de otras regiones del cerebro ha revelado además la presencia de la enzima en regiones tales como el hipocampo (Sanghera MK y cols., 1991; MacLusky NJ y cols., 1994; Saldanha CJ y Schlinger BA, 1997; Wehrenberg U y cols., 2001), la corteza cerebral (Sanghera MK y cols., 1991; MacLusky NJ y cols., 1994), el cerebelo (Sakamoto H y cols., 2003) o la oliva inferior (Sierra A y cols., 2003).

In vivo y en condiciones fisiológicas sólo se ha observado su expresión en neuronas (Balthazart J y Ball GF, 1998; Hojo Y y cols., 2004; Yague JG y cols., 2006; Lephart ED, 1996), localizándose mayoritariamente en el retículo endoplasmático aunque en algunos estudios se ha encontrado también la presencia de la aromatasa en fibras y en botones presinápticos (Naftolin F y cols., 1996; Peterson RS y cols., 2005; Mukai H y cols., 2006).

Las células gliales, en condiciones normales, no suelen expresar la aromatasa. No obstante, se ha observado que los astrocitos, en condiciones de neurodegeneración, comienzan a expresar la enzima en respuesta a la agresión (Zwain IH y Yen SS, 1999; Zwain IH y cols., 1997; Liu M y cols., 2007; Azcoitia I y cols., 2003a; Carswell HV y cols., 2005; Garcia-Segura LM y cols., 1999). También se ha detectado la expresión de la enzima en astrocitos procedentes de cultivos primarios.

Aunque la aromatasa cerebral se ve afectada por la regulación endocrina (Prange-Kiel J y cols., 2008), la testosterona al poder ser sintetizada en el cerebro a partir del colesterol endógeno (Hojo Y y cols., 2004), permite que el papel neuromodulador de la aromatasa pueda ser, al menos en parte, independiente de la testosterona exógena.

3. FUNCIONES DEL ESTRADIOL EN EL CEREBRO.

3.1 DESARROLLO CEREBRAL.

3.1.1 Estado embrionario.

El cerebro de los fetos y recién nacidos está expuesto al estradiol sintetizado localmente y al que procede de sus madres y de sus propias gónadas. El cerebro en desarrollo expresa altos niveles de los receptores de estrógeno (Bakker J y cols., 1997; Gerlach JL y cols., 1983; Handa RJ y cols., 1991; MacLusky NJ y cols., 1979) en consonancia con su acentuada sensibilidad a sus efectos.

INTRODUCCIÓN

El estradiol influye en el tamaño de regiones o subnúcleos particulares del cerebro regulando la supervivencia neuronal. Varios trabajos que analizaban el efecto del estradiol sobre la proliferación de las neuronas y la glia (Jacobson CD y Gorski RA, 1981; Park JJ y cols., 1996; Wang L y cols., 2003) o sobre la migración neuronal (Jacobson CD y Gorski RA, 1981; Park JJ y cols., 1996), descartaron que dichos procesos estuvieran implicados en el efecto del estradiol sobre el tamaño del hipotálamo. Así pues, es fundamentalmente mediante la regulación de la apoptosis, como el estradiol modula el número de células en una región cerebral. La modulación que el estradiol ejerce sobre la muerte celular que ocurre de forma natural en el cerebro durante el desarrollo, está limitada a regiones muy específicas y puede tener efecto contrario, de tal modo que en algunos casos promueve la supervivencia celular y en otros, la pérdida celular (Rhees RW y cols., 1990; Forger NG, 2006).

Además, el estradiol promueve el crecimiento de neuritas en cultivos organotípicos de hipotálamo, del área preóptica y de la corteza cerebral (Toran-Allerand CD, 1976, 1980, 1983). Para ello, activa la expresión de factores de crecimiento como el factor de crecimiento neuronal (NGF) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) y de proteínas estructurales implicadas en la extensión de las prolongaciones neuríticas como son la proteína 43 asociada al crecimiento (GAP-43) y la proteína asociada a los microtúbulos (MAP-2) (Garcia-Segura LM y cols., 2006; Toran-Allerand CD y cols., 1999). La activación de la vía de las MAPKs por el estradiol, también es importante para el crecimiento de las neuritas (Carrer HF y cols., 2005; Cambiasso MJ y cols., 2000). Además, en neuronas de hipotálamo en cultivo, el estradiol promueve la ramificación de las dendritas (Speert DB y cols., 2007).

Al igual que se observaba con la apoptosis, la acción del estradiol sobre el crecimiento de neuritas puede tener efectos opuestos dependiendo de la región cerebral afectada. De hecho, el estradiol en concentraciones fisiológicas, inhibe el crecimiento de neuritas en neuronas serotoninérgicas provenientes de mesencéfalo embrionario (Lu H y cols., 2004).

La cantidad y la naturaleza de las conexiones que una región cerebral recibe, es tan importante como la cantidad de neuronas que tenga. Por ello, las respuestas fisiológicas y conductuales complejas, requieren una red neural capaz de coordinar una gran cantidad de información proveniente tanto del interior como del exterior. El estradiol actúa en el cerebro en desarrollo, preconditionando la red neural para que en

el adulto las hormonas puedan provocar la respuesta correcta. Esto es posible gracias a que el estradiol es un potente modulador de la formación de espinas dendríticas, la parte principal de las sinapsis glutamatérgicas excitatorias. En el adulto, el estradiol también promueve la generación de espinas dendríticas, sin bien hay diferencias importantes respecto al efecto en neonatos. En primer lugar, la magnitud del efecto es significativamente mayor en neonatos que en adultos (Calizo LH y Flanagan-Cato LM, 2000; Woolley CS y McEwen BS, 1992; Schwarz JM y McCarthy MM, 2008). En segundo, la inducción de espinas por estradiol en adulto es transitoria, de tal manera que cuando desaparece el estradiol, también lo hacen las espinas. Sin embargo en neonatos, las espinas que se forman durante los primeros días siguientes al nacimiento se mantienen en el adulto (Amateau SK y McCarthy MM, 2004; Matsumoto A y Arai Y, 1980). Estas diferencias en la inducción de espinas por el estradiol en el cerebro en desarrollo y maduro, sugieren que tanto el mecanismo de generación, como la función de las nuevas espinas, es esencialmente diferente.

El efecto del estradiol sobre la sinaptogénesis, nuevamente depende de la región sobre la que actúe ya que en algunos casos la promueve y en otros la inhibe.

Las acciones del estradiol en el cerebro en desarrollo son generalmente permanentes y generan diferencias sexuales. De hecho, la aromatasa cerebral, al regular los niveles locales de estradiol, participa en la diferenciación sexual de las regiones del cerebro implicadas en el control de la secreción de gonadotropinas y del comportamiento sexual que tiene lugar durante el desarrollo (Fusani L y Gahr M, 2006; MacLusky NJ y Naftolin F, 1981; Lephart ED, 1996; Naftolin F, 1994).

3.1.2 Pubertad.

Con la llegada de la pubertad, se reactiva la generación de pulsos de hormona liberadora de gonadotropinas en el hipotálamo, que a través de la hipófisis actúa sobre el ovario que en respuesta al estímulo, empieza a ciclar. Esta señal viene dada por una disminución en la neurotransmisión GABAérgica y por el concomitante incremento en la entrada de neurotransmisores excitadores de naturaleza aminoacídica (incluyendo el glutamato) y posiblemente por el aumento en la liberación de factores tróficos por la glia (Grumbach MM, 2002).

La madurez sexual está asociada al desarrollo de cambios en el apetito sexual, la motivación, la emoción y funciones cognitivas (Steinberg L, 2005). Estos cambios son posibles por el alto grado de plasticidad que durante el desarrollo presenta el cerebro. Axones, dendritas, sinapsis y receptores de sinapsis son modulados en

INTRODUCCIÓN

múltiples áreas cerebrales al pasar de la pubertad al estado adulto (Sisk CL y Zehr JL, 2005). En estudios en el hombre, se ha detectado que el volumen de la sustancia gris en varias regiones de la corteza cerebral, no alcanza su estado en el adulto, hasta la mitad de la veintena (Giedd JN y cols., 1999; Gogtay N y cols., 2004). Además, el ritmo de crecimiento de las fibras que inervan áreas de la corteza relacionadas con el lenguaje o la asociación se ve atenuado después de la pubertad (Thompson PM y cols., 2000) y hay una reducción notable del número de sinapsis durante la adolescencia y el comienzo de la edad adulta (Gogtay N y cols., 2004).

En estudios con animales se ha observado la existencia de cambios importantes en la estructura de la corteza durante la maduración sexual. En neuronas de hipocampo de ratas macho, la densidad de espinas dendríticas se incrementa con la llegada de la pubertad y después de ella, decrece (Meyer G y cols., 1978). En la corteza somatosensorial de monos Rhesus la sobreproducción de sinapsis en la infancia, es seguida por un proceso de eliminación del número de sinapsis durante la pubertad y la adolescencia (Zecevic N y Rakic P, 1991). La densidad neuronal también es modificada durante la pubertad y la adolescencia en la corteza prefrontal. Así, se ha detectado un incremento en la muerte celular de la corteza visual de ratas hembra durante la adolescencia (Nuñez JL y cols., 2001) y el número total de neuronas en la corteza prefrontal ventromedial disminuye entre los 35 y los 90 días postnatales tanto en ratas hembra como en ratas macho, siendo más pronunciado el cambio en hembras (Markham JA y cols., 2007). Además, el volumen de la corteza prefrontal ventromedial se ve reducido en hembras pero no en machos entre los 35 y los 90 días postnatales (Markham JA y cols., 2007).

En base a las diferencias sexuales en la maduración del cerebro durante la pubertad sería posible que las hormonas sexuales estuvieran implicadas en dicho proceso (Reid SN y Juraska JM, 1992; Giedd JN y cols., 1997; De Bellis DM y cols., 2001; Nuñez JL y cols., 2001; Giedd JN, 2004; Markham JA y cols., 2007). Además, el descenso del número de neuronas en la corteza visual de ratas hembra durante la pubertad, es prevenido por la ovariectomía antes de la pubertad, sugiriendo que las hormonas ováricas son las principales reguladoras de los cambios durante el desarrollo (Nuñez JL y cols., 2002). De hecho, es bien conocida la capacidad del estradiol, de regular la supervivencia neuronal, el desarrollo sináptico y la plasticidad sináptica (Mendez P y cols., 2006; Woolley CS, 2007) por lo que la hormona puede estar involucrada en los cambios de maduración que durante la pubertad ocurren en el cerebro.

3.2 NEUROPROTECCIÓN.

La neuroprotección, es un aspecto del estradiol ampliamente probado tanto *in vivo* como *in vitro* y en numerosos modelos animales (Singer CA y cols., 1999; Zhao L y Brinton RD, 2007; Choi JS y cols., 2008; Quesada A y cols., 2008; D'Astous y cols., 2004; Garcia-Segura LM y cols., 2001; Lee SJ y McEwen BS, 2001; Rau SW y cols., 2003).

Más allá de los modelos experimentales, algunos estudios sugieren que esta acción neuroprotectora del estradiol es aplicable al hombre. En algunos estudios epidemiológicos, se ha mostrado una menor incidencia de patologías nerviosas como la enfermedad de Alzheimer y Pákinson, la esquizofrenia o el infarto cerebral en mujeres premenopáusicas con respecto a hombres de la misma edad (Turgeon JL y cols., 2004).

Estos efectos beneficiosos del estradiol en el cerebro implican la regulación de muchos procesos como la supervivencia celular y la apoptosis, la respuesta inflamatoria, el control de la transmisión sináptica o la regeneración axonal (Maggi A y cols., 2004). Y afectan al menos a los principales componentes del cerebro: las neuronas, los astrocitos, los oligodendrocitos y las células microgliales (Tripanichkul W y cols., 2007; Dhandapani KM y Brann DW, 2007; Zhu TS y Glaser M, 2008; Bruce-Keller AJ y cols., 2000).

La molécula de estradiol, tiene efecto neuroprotector en sí misma, debido a las propiedades antioxidantes que le confiere el grupo hidroxilo que el anillo A presenta en la posición C3 (Behl C y cols., 1997). Para que se ponga de manifiesto en estudios *in vitro* dicho efecto neuroprotector, se necesitan dosis suprafisiológicas de la hormona (Moosmann B y Behl C, 1999). Este hecho, no debe descartarse la posibilidad de que *in vivo*, el estradiol ejerza este papel antioxidante, ya que aunque se desconocen los niveles de concentración local de estradiol que se alcanzan en el cerebro ante una lesión, se sabe que tras un daño, se activa la expresión de la aromatasa en los astrocitos que rodean la lesión (Peterson RS y cols., 2001; Garcia-Segura LM y cols., 1999).

A pesar de su capacidad antioxidante, el estradiol generalmente desarrolla su papel neuroprotector a través de sus receptores. Así, la inhibición de los receptores de estrógeno mediante su antagonista, el ICI182780, bloquea la neuroprotección que los estrógenos ejercen en cultivos de neuronas hipotalámicas privadas de suero (Chowen

INTRODUCCIÓN

JA y cols., 1992) y en cultivos de células corticales tratadas con dosis excitotóxicas de glutamato (Singer CA y cols., 1999). Efectos similares han sido observados *in vivo*, de tal manera que la administración de ICI182780 exacerba la lesión que induce la isquemia en el estriado de ratones hembra no ovariectomizados (Sawada M y cols., 2000) o bloquea la capacidad del estradiol de proteger a las neuronas hilares del hipocampo de la excitotoxicidad inducida por ácido kaínico (Azcoitia I y cols., 1999).

Ya hemos comentado que el estradiol regula la formación de sinapsis durante el desarrollo y que induce plasticidad sináptica en el cerebro adulto al controlar proteínas implicadas en el proceso como son la sinaptofisina y la forma fosforilada de la proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (CREB) (Sharma K y cols., 2007). (Matsumoto A, 1991; Garcia-Segura LM y cols., 1994; McEwen BS, 1996; Wooley CS, 1998). Pero además, el estradiol es capaz de promover la generación de nuevas proyecciones sinápticas en respuesta a un daño en el núcleo arcuato (Matsumoto A y Arai Y, 1979; 1981), en la corteza entorrinal (Morse JK y cols., 1986, 1992) y en las motoneuronas del nervio facial (Tanzer L y Jones KJ, 1997).

El estradiol incrementa la síntesis de tau en los axones contribuyendo a la estabilización de los microtúbulos y promoviendo el crecimiento axonal (Ferreira A y Caceres A, 1991; Lorenzo A y cols., 1992; Diaz H y cols., 1992). Otra proteína que debe de estar implicada en la generación de nuevas proyecciones sinápticas por el estradiol, es la ApoE (Stone DJ y cols., 1998; Teter B y cols., 1999). La ApoE, está involucrada en la movilización y la reutilización de lípidos en la reparación, el crecimiento y el mantenimiento de la mielina y la membrana axonal durante el desarrollo o tras una lesión. Además, las regiones en las que el estradiol promueve regeneración, son las mismas en las que la generación de nuevas proyecciones es dependiente de ApoE (Teter B y cols., 1999).

El efecto neuroprotector del estradiol se debe, al menos en parte, a la modulación de la expresión de moléculas implicadas en el control de la muerte celular. La familia de proteínas relacionadas con Bcl-2 se encarga de la regulación de la muerte y de la supervivencia celular. Mientras que Bcl-2, y Bcl-X_L son antiapoptóticas, Bax, Bad y Bid son proapoptóticas (Merry DE y Korsmeyer SJ, 1997; Sastry PS y Rao KS, 2000).

El estradiol promueve la expresión de Bcl-2 en el neuroblastoma NT-2 (Singer CA y cols., 1998) y en neuronas de rata adulta (Garcia-Segura LM y cols., 1998) y previene la bajada en el nivel de esta proteína asociada con la isquemia cerebral

(Dubal DB y cols., 1999). Así mismo, incrementa la expresión de Bcl-X_L en cultivos de neuronas de hipocampo (Pike CJ, 1999) y de neuronas del ganglio de la raíz dorsal de rata (Patrone C y cols., 1999). También se ha observado que el estradiol reduce la expresión de Bad (Gollapudi L y Oblinger MM, 1999).

Finalmente, en el desarrollo de su papel neuroprotector, los estrógenos también tienen la capacidad de bloquear, mediante diversos mecanismos, la inducción de la actividad de algunos miembros de la familia de las caspasas, unas proteínas esenciales en la iniciación y el desarrollo de los programas apoptóticos en la célula (Pike CJ, 1999; Rau SW y cols., 2003). Así pues, el estradiol disminuye la liberación de citocromo c de la mitocondria (Bagetta G y cols., 2004, Zhang Y y Bhavnani BR, 2005), un evento clave en la activación de las caspasas y de la apoptosis. O induce la expresión del factor inhibitorio de caspasas (CIF) que previene la apoptosis en neuronas (Zhang Y y cols., 2001).

La expresión de la aromatasa por parte de astrocitos en respuesta a una lesión, parece constituir un mecanismo importante de neuroprotección ya que permite la síntesis de estradiol justo en el lugar en el que se necesita (Garcia-Segura LM y cols., 1999; Peterson RS y cols., 2001, 2004; Carswell HV y cols., 2005).

3.3 EFECTO DEL ESTRADIOL EN EL ENVEJECIMIENTO.

El envejecimiento afecta a todos los tejidos y órganos, incluyendo el cerebro. Las variaciones individuales existentes en la pérdida de las habilidades cognitivas, el desarrollo de desórdenes afectivos o las enfermedades neurodegenerativas asociadas al envejecimiento, sugieren que el deterioro del cerebro no es únicamente el resultado del envejecimiento en si mismo, sino que probablemente representa un fallo adaptativo a los cambios homeostáticos asociados a la edad (Mattson MP y Magnus T, 2006).

Las hormonas están involucradas en el proceso de envejecimiento ya que los niveles en plasma de muchas de ellas cambian con el envejecimiento. En mamíferos, varias de ellas disminuyen con la edad (Lamberts SWJ y cols., 1997). En el caso concreto del hombre, estos cambios van asociados en el tiempo, a la progresión de desórdenes neurodegenerativos y el incremento de síntomas depresivos y de otros trastornos psicológicos (Resnick SM y Maki PM, 2001; Azcoitia I y cols., 2003; Sonntang WE y cols., 2005). Esto sugiere que la modificación de los niveles de las hormonas con el envejecimiento debe de tener un impacto negativo en la función cerebral. Alternativamente, teniendo en cuenta que el cerebro es un importante centro de control neuroendocrino, su envejecimiento podría dar lugar a cambios en las

INTRODUCCIÓN

hormonas. A su vez, estos cambios hormonales podrían representar una respuesta de adaptación al proceso del envejecimiento, ya que las evidencias acumuladas sugieren que la vida animal podría estar sometida a la regulación endocrina (Holzenberger M y cols., 2004).

La rata hembra, aproximadamente a los 10-12 meses de edad, muestra signos graduales de cambios en el ciclo estral. Los ciclos se hacen irregulares y se alargan aumentándose el número de días de diestro o de estro. A esta edad, los niveles de estradiol de la circulación son altos en el día 2 del diestro y durante el proestro (Merry BJ y Holehan AM, 1996).

3.4 TERAPIA HORMONAL SUSTITUTIVA.

La disminución de los niveles de estradiol y progesterona circulantes que se produce durante la menopausia, supone un aumento en el riesgo de padecer osteoporosis, enfermedades cardiovasculares y alteraciones cognitivas, además del desarrollo de los síntomas visibles, como son los sofocos y la interrupción de los patrones de sueño (Mhyre AJ y Dorsa DM, 2006). La terapia hormonal se ha prescrito clínicamente en mujeres postmenopáusicas para aliviar estos y otros síntomas. Este tratamiento consiste en la administración a corto o largo plazo de una o varias formas de hormonas sexuales femeninas (estrógenos y progestágenos) con el fin de compensar la disminución en sus niveles que tiene lugar como consecuencia de la senescencia reproductiva de la mujer. La terapia se ha asociado con la reducción de la disminución de la densidad de los huesos que se asocia con la edad, con la protección del tejido cardiovascular y con un posible aumento de habilidades cognitivas (Turgeon JL y cols., 2004; Sherwin BB, 2002). Estos descubrimientos epidemiológicos de los beneficios de la terapia hormonal en las capacidades cognitivas son esperables, pues en numerosos estudios se ha mostrado que el estradiol puede promover neuroprotección en una gran variedad de modelos de desordenes neurológicos, incluyendo infarto cerebral y la enfermedad de Alzheimer (Behl C y Moosmann B, 2002; Wise PM y cols., 2000). Sin embargo, existen actualmente algunos estudios que cuestionan la utilidad de las terapias hormonales basándose sobre todo, en los indudables efectos secundarios no deseados en algunos tejidos. Algunas formas de tratamiento hormonal sustitutivo han sido asociadas a un incremento de la incidencia de carcinomas de mama y a un aumento del riesgo de infartos en el sistema cardiovascular (Paganini-Hill A, 2001). Ninguno de los estudios se puede considerar

definitivo ya que determinados aspectos importantes como la edad y la obesidad, no fueron tomados en consideración (Turgeon JL y cols., 2004).

A pesar de las conclusiones contradictorias de los diferentes estudios, es indiscutible que el estradiol ejerce efectos beneficiosos en el cerebro pero que, a su vez, tiene efectos neoplásicos. Por ello se está investigando sobre la conveniencia del uso de los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs), que actúan a través de los receptores de estrógeno, presentando selectividad de tejido. Algunos SERMs actúan como agonistas mientras que otros lo hacen como antagonistas. Sea como fuere, a partir de estos trabajos, el interés en el estudio de las hormonas sexuales como mediadores de procesos de neuroprotección se ha incrementado notablemente. En los últimos años, a raíz de los resultados de los estudios sobre mujeres que siguen el tratamiento hormonal sustitutivo, se han llevado a cabo numerosos experimentos con el fin de profundizar en las bases celulares y moleculares de la neuroprotección por estrógenos.

4. MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ESTRADIOL.

Tradicionalmente, se han dividido los mecanismos de acción del estradiol en dos grupos, los llamados “genómicos” o “lentos” y los “no genómicos” o “rápidos”. Refiriéndose en el primer caso a los mecanismos en los que el estradiol interacciona con los receptores de estrógeno y promueve su translocación al núcleo para activar la transcripción génica. Y englobando en el segundo bloque a aquellos en los que el estradiol interacciona con los receptores de estrógeno en membrana o citoplasma y promueve la activación de varias vías de señalización intracelular. Estos últimos mecanismos, generalmente requieren menos tiempo que los “genómicos” de ahí el apelativo de “rápidos” frente a “lentos”.

Sin embargo, en base a la aparición de publicaciones en las que se demuestra como muchos de esos mecanismos llamados “no genómicos” terminan produciendo una regulación transcripcional, recientemente se está empezando a emplear una nueva nomenclatura más correcta. Cambiando el apelativo de “mecanismo genómico” por “mecanismo iniciado en el núcleo” y el de “mecanismo no genómico” por “mecanismo iniciado en membrana”.

INTRODUCCIÓN

4.1 MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ESTRADIOL INICIADOS EN EL NÚCLEO.

Los receptores de estrógeno, son factores de transcripción. El receptor para poder desarrollar su regulación transcripcional, tiene que ser reclutado a la región del promotor del gen diana, ya sea por una interacción directa con secuencias consenso del DNA o por la interacción proteína-proteína con otros factores de transcripción. La actividad de transactivación de los receptores de estrógeno se inicia por la interacción del receptor unido al ligando con la secuencia consenso ERE, que actúa como potenciador, de las regiones reguladoras localizada en los promotores de los genes diana (Beato M, 1989).

En el genoma, existen secuencias ERE completas, pero también imperfectas, o simplemente con pequeñas similitudes. La secuencia de los elementos de respuesta, afecta a la afinidad con la que el receptor se une al DNA. Como es de esperar, el ER α se une con mayor afinidad a secuencias consenso ERE completas, que a aquellas que están incompletas (Loven MA y cols., 2001a). Esto indica que la secuencia de los elementos de respuesta puede determinar, al menos en parte, cual de los receptores de estrógeno pueden activar la expresión génica (Loven MA y cols., 2001a,b).

La secuencia específica del elemento de respuesta, puede ejercer distintos efectos alostéricos en la conformación del ER α o del ER β de tal modo que la unión de los receptores al DNA limite su proteólisis (Loven MA y cols., 2001a). La unión del ligando, también induce cambios en la conformación de los receptores de estrógeno que influyen en su interacción con coactivadores. Del mismo modo, la interacción de los receptores con secuencias EREs completas o incompletas influye en su capacidad de unirse a los coactivadores (Wood JR y cols., 2001).

Los receptores de estrógeno en su unión al DNA, necesitan interaccionar con proteínas correguladoras, con función coactivadora o correpresora, para formar el complejo que constituye la plataforma sobre la que se ensamblarán las proteínas de la maquinaria transcripcional (Smith CL y O'Malley BW, 2004). La unión de los receptores de estrógeno a agonistas o antagonistas, induce modificaciones estructurales en la molécula. Esta reorganización estructural es tan crítica para la regulación transcripcional inducida por ligando, como lo es la exposición de la superficie del receptor que recluta proteínas coactivadoras y correguladoras (Jordan CV, 2003a, b).

En la expresión génica dependiente de los receptores de estrógeno intervienen varias vías de señalización celular, modulando cambios conformacionales en los mismos o reclutando correguladores (Smith CL y O'Malley BW, 2004). Por ello, la

fosforilación de ER α en respuesta a estradiol o a un factor de crecimiento, incrementa la actividad transcripcional de los receptores de estrógeno (Lannigan DA, 2003). Parece, además, que la fosforilación, altera las interacciones de los receptores con diferentes correguladores (Lavinsky RM y cols., 1998).

En los modelos de acción de los receptores de estrógeno, se asume que sólo la forma dimérica del receptor manifiesta la capacidad de regular la transcripción génica. Muchos grupos han demostrado, que el ER α y el ER β , forman heterodímeros tanto *in vivo*, como *in vitro* y que si se expresan las dos isoformas, los heterodímeros son predominantes (Pettersson K y cols., 1997). La cantidad de heterodímeros formados parece depender de la cantidad relativa que haya de cada isoforma (Li X y cols., 2004). La capacidad de los receptores de formar heterodímeros sugiere que los receptores de estrógeno puedan actuar en los tres estados diméricos y que cada uno de estos estados puede regular la expresión de diferentes genes diana (Hall JM y McDonnell DP, 1999).

La activación por los receptores de estrógeno de genes que carecen de elementos de respuesta a estrógeno en su promotor, requiere la presencia de factores de transcripción que medien la asociación de los receptores con el DNA (O'Lone R y cols., 2004). Hay varios factores de transcripción, que desarrollan este papel, como el factor nuclear κ B (NF κ B) a través del cual el estradiol bloquea la síntesis de interleuquina 6 (Galien R y Garcia T, 1997). Otro factor intermediario a través del cual los receptores de estrógeno pueden asociarse a los promotores es el factor de activación transcripcional (ATF). Así, a través del complejo ATF2-*c-jun* o ATF2-CREB, el estrógeno activa el gen de la ciclina D1, mientras que a través del complejo ATF1-CREB activa el gen de Bcl2 (O'Lone R y cols., 2004). Los receptores, también pueden interaccionar con el complejo transcripcional fos-jun para estimular la expresión de los genes que tengan secuencias para la proteína activadora 1 (AP1).

El correcto desarrollo de la actividad transcripcional del ER α , requiere que dicho receptor sea ubiquitinado y degradado en el proteasoma (Lonard DM y cols., 2000). Este proceso que promueve la regeneración del receptor, se da tanto en el receptor libre, como en el unido a ligando, aunque el mecanismo de regulación parece ser diferente (Tateishi Y y cols., 2004; Reid G y cols., 2003). La ubiquitinación y consiguiente degradación del ER α unido a ligando, juega un papel importante en la regulación de los niveles nucleares de receptor y controla la duración y la magnitud de la actividad transcripcional del receptor en respuesta al ligando. Por otra parte, la

INTRODUCCIÓN

ubiquitinación y degradación del receptor libre, parece estar implicada en el control cualitativo del receptor.

4.2 MECANISMOS DE ACCIÓN DEL ESTRADIOL INICIADOS EN LA MEMBRANA.

No todas las acciones del estradiol son iniciadas por la translocación de los receptores de estrógeno al núcleo para promover la regulación de la expresión de los distintos genes diana. De hecho, el estradiol puede interaccionar con los receptores de estrógeno en la membrana plasmática, el citoplasma y la mitocondria, tanto en neuronas como en células gliales, para activar la vía de la PI3K (Cardona-Gomez GP y cols., 2002; McEwen B, 2002), la vía de las MAPKs (Benito M y cols., 1996; Toran-Allerand CD y cols., 1999) que promueve la fosforilación CREB (Gu G y cols., 1996; Murphy DD y Segal M, 1997; Zhou Y y cols., 1996), o la de las proteínas G (Moss RL y Gu Q, 1999; Raap DK y cols., 2000) a través de la cual modifica el nivel de calcio intracelular (Beyer C y Raab H, 1998; Carrer HF y cols., 2003; Mermelstein PG y cols., 1996; Pozzo-Miller LD y cols., 1999). Todos estos efectos del estradiol, son los que constituyen los mecanismos de acción iniciados en membrana y se caracterizan por ocurrir rápidamente (en segundos o minutos), lo que hace imposible la mediación de toda una serie de procesos biosintéticos complejos como la transcripción y la traducción de proteínas. Estos mecanismos iniciados en membrana, incluyen procesos dependientes e independientes de los receptores de estrógeno y como su nombre indica, se activan en primera instancia a nivel de membrana plasmática (Nadal A y cols., 2001).

La principal vía de las MAPKs regulada por el receptor de estrógeno es la de la quinasa regulada extracelularmente (ERK). Hay múltiples modelos en los que se ha comprobado esta capacidad del estradiol de activar la vía de las MAPK-ERK (Keshamouni VG y cols., 2002; Song RX y cols., 2002; Migliaccio A y cols., 1996), sin embargo se desconoce el mecanismo concreto por el que ejerce dicha regulación. Se ha observado que el estradiol puede inducir la fosforilación de la proteína adaptadora Shc (un homólogo de Src) promoviendo la formación del complejo Shc-Grb2-Sos que conduce a la activación de Ras, desencadenando la activación de la vía de las MAPKs (Song RX y cols., 2002). La proteína quinasa dependiente de calcio (PKC), también, parece estar implicada en la regulación que el estradiol ejerce sobre la vía de las MAPKs, ya que su inhibición, bloquea la activación de la vía de las MAPKs por estradiol (Keshamouni VG y cols., 2002). Una vez activada, ERK se puede translocar

al núcleo e interaccionar, directamente o indirectamente, con factores nucleares de transcripción. El estradiol, a través de la activación de ERK, induce la fosforilación y la consiguiente activación de los factores de transcripción Elk-1 (Song RX y cols., 2002) y CREB (Wade CB y Dorsa DM, 2003; Ronda AC y cols., 2007). De esta manera, promoviendo la translocación al núcleo de ERK, señales que se originan en membrana, regulan la transcripción génica. De hecho, la capacidad del estradiol de activar ERK debe de ser un mecanismo adicional por el que el estradiol regula la expresión de genes que no contienen elementos de respuesta a estrógeno como la creatin quinasa (Sukovich DA y cols., 1994), la β -tubulina (Guo JZ y Gorski J, 1988) y la MAP-2 (Lorenzo A y cols., 1992).

A través de la asociación directa del ER α con la PI3K, los estrógenos promueven su activación (Castoria G y cols., 2001; Mendez P y cols., 2003). Una vez activa, la PI3K promueve la activación de la quinasa dependiente de fosfoinosítidos 1/2 (PDK1/2) que a su vez, produce la de Akt, un mediador de la supervivencia. Akt puede inhibir la apoptosis inducida por diferentes estímulos, actuando sobre varios factores implicados en la muerte celular como son los miembros de la familia de Bcl2 o la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3). Así, Akt fosforila e inactiva a la proteína proapoptótica Bad (Datta SR y cols., 1999) o incrementa la cantidad de Bcl2 presente en la célula (Pugazhenth S y cols., 2000). También puede inhibir la actividad de la GSK3, incrementando la fosforilación inhibitoria de las serinas 9 y 21 (Cohen P y Frame S, 2001). El mecanismo mediante el cual el estradiol regula la actividad de la vía de señalización de la PI3K parece implicar al ER α , pero no al ER β (Simoncini T y cols., 2000). En el hipotálamo y el hipocampo la activación de la vía de la PI3K por estradiol, va asociada a un incremento en la interacción del ER α con el sustrato del receptor de insulina tipo 1 (IRS-1) y con la subunidad reguladora de la PI3K, la proteína p85 (Mendez P y cols., 2003).

Finalmente, la interacción de los receptores de estrógeno con las vías de señalización acopladas a proteínas G (Kelly MJ y Levin ER, 2001) se produce, según se ha demostrado en líneas celulares, mediante la interacción física de los ER con distintos tipos de subunidades α de las proteínas G (Razandi M y cols., 2004). A través de las subunidades G α_s , el receptor de estrógeno controla la actividad de la adenilato ciclasa (Filardo EJ y cols., 2002), la enzima encargada de la producción de AMPc. Mediante su asociación a la subunidad G α_q , el estradiol interfiere con la actividad de la fosfolipasa C (Qiu J y cols., 2003) que controla los niveles de dos mediadores de la

INTRODUCCIÓN

señalización intracelular como son el diacilglicerol (DAG) y el inositol trifosfato (I3P), responsables de la liberación de calcio y de la activación de la PKC. Recientemente, además, se ha descubierto que el receptor acoplado a proteínas G 30 (GPR30), es capaz de unir estradiol con una alta afinidad (Thomas P y cols., 2005). Esta proteína, localizada en el retículo endoplasmático, media algunos efectos rápidos de los estrógenos en los sistemas de señalización intracelular (Revankar CM y cols., 2005).

4.3 RECEPTORES DE ESTRÓGENO.

Como hemos visto, para ejercer estas acciones, el estradiol necesita interaccionar y activar a los receptores de estrógeno. En mamíferos sólo se han caracterizado dos isoformas del receptor de estrógenos, el ER α y el ER β . Mientras que el ER α se conoce desde 1985 (Walter P y cols., 1985), no se conoció la existencia del ER β hasta el 1996 (Kuiper GG y cols., 1996).

Ambos receptores, aunque están codificados por genes separados, presentan una estructura proteica muy similar. Como miembros de la superfamilia de los receptores nucleares son proteínas modulares divididas en regiones comunes llamadas A-B, C, D, E y F. Estas regiones participan en la formación de dominios funcionales independientes que interaccionan entre sí: el dominio de transactivación N-terminal, el dominio de unión al DNA (DBD), el dominio de dimerización, la secuencia de localización nuclear (NLS) y el dominio de unión al ligando (LBD) (figura 5) (Ascenzi P y cols., 2006).

Las regiones A y B de los receptores de estrógeno contienen la función de activación 1 (AF1) y están implicadas en la interacción proteína-proteína y en la activación transcripcional de la expresión de los genes diana mediante la interacción con la maquinaria de transcripción primaria (McInerney EM y cols., 1998). El dominio AF1 de las dos isoformas del receptor de estrógeno difiere tanto en la longitud como en la secuencia de aminoácidos. En el ER α , estimula potentemente la expresión de constructos que contienen el elemento de respuesta a estrógeno (ERE) en el promotor, mientras que en el caso del ER β la estimulación es insignificante (Nilsson S y cols., 2001).

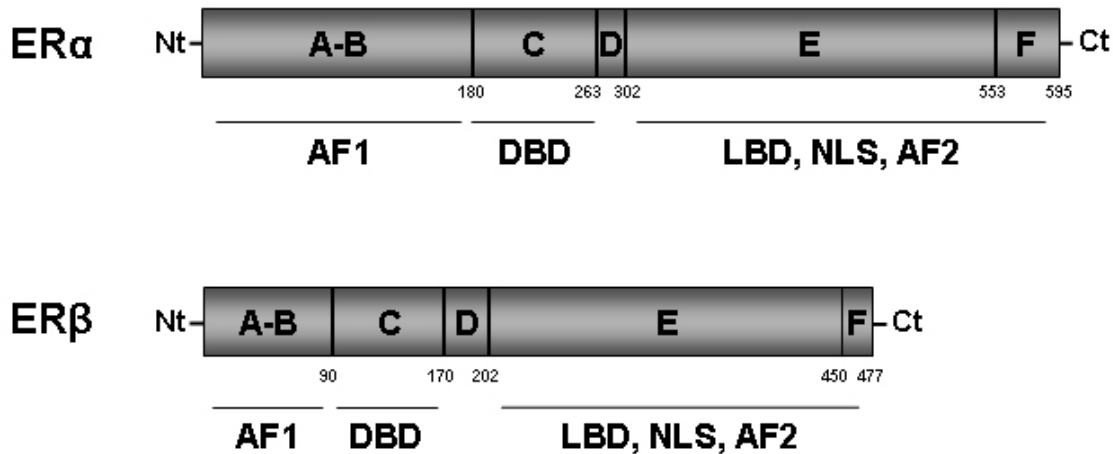


Figura 5. Esquema de la estructura básica de las dos isoformas del receptor de estrógeno en el hombre. Se muestran los distintos dominios que conforman ambos receptores y el número de los residuos que los limitan. En la región A-B reside la primera de las dos funciones de activación (AF) de los receptores de estrógeno. La otra está en la región E, que junto con la región F contiene el dominio de unión al ligando (LBD) y parte de la secuencia de localización nuclear (NLS). La región C es la que contiene el dominio de unión al DNA.

El dominio de unión al DNA es el correspondiente a la región C y juega un papel importante en la dimerización del receptor y en la unión a secuencias específicas del DNA. Es la región más conservada de los receptores de estrógeno y puede dividirse en dos subdominios diferentes tanto estructural como funcionalmente.

El primer subdominio está implicado, fundamentalmente, en la unión específica al DNA, debido a su capacidad de reconocer la secuencia ERE (Ascenzi P y cols., 2006), mientras que el segundo está implicado en la dimerización (Kumar R y cols., 2004).

La región D es la más variable entre las dos isoformas del receptor de estrógeno y contiene el dominio bisagra.

En el C-terminal, las regiones E y F abarcan el dominio de unión a ligando, el AF-2, el dominio de homo/heterodimerización y parte de la secuencia de localización nuclear. El dominio de unión a ligando es la segunda región más conservada entre los dos receptores (Kumar R y cols., 2004).

En ausencia de ligando, los receptores de estrógeno se encuentran unidos a las proteínas de choque térmico 90 y 70 (Hsp90 y Hsp70) en un complejo multiproteico de chaperonas. Para dicha interacción, es imprescindible el dominio LBD. Esta interacción, expone el sitio de unión al ligando, permitiendo el acceso a los estrógenos. Además, toda esta maquinaria proteica interacciona dinámicamente con el receptor activado por la unión del ligando, para facilitarle el desplazamiento por la célula a lo

INTRODUCCIÓN

largo de los microtúbulos (Pratt WB y cols., 2004). La unión del receptor a su ligando, induce una modificación estructural de tal magnitud, que le permite dimerizar y translocarse al núcleo.

Como ya se ha comentado, el estradiol controla muchos de los aspectos de la fisiología humana, incluyendo el desarrollo, la reproducción y la homeostasis a través de la regulación de la actividad transcripcional de sus receptores. Los receptores de estrógeno son unas proteínas con mucho movimiento que continuamente se están trasladando entre proteínas diana localizadas en diversos compartimentos celulares. Esto permite generar señales de transducción sinérgicas y variadas (genómicas y no genómicas) que aportan versatilidad a la respuesta que induce el estradiol en la célula.

5. INTERACCIÓN CON FACTORES TRÓFICOS.

El factor de crecimiento nervioso, el factor neurotrófico derivado de cerebro y la neurotrofina 3 (NT-3), son algunas de las neurotrofinas que interaccionan con la señalización por estradiol en diferentes áreas del sistema nervioso (Toran-Allerand CD 1996). Así pues, el estrógeno regula la expresión de BDNF y de NGF (Simpkins JW y cols., 1997; Gibbs RB y cols., 1994) y de sus receptores p75 y trkA (Sohrabji F y cols., 1994), con especificidad de región cerebral. A su vez, las neurotrofinas regulan la expresión de los receptores de estrógeno en diferentes poblaciones neuronales (Miranda RC y cols., 1994).

Los receptores de estrógeno y los de neurotrofinas se coexpresan en las mismas células, como se demostró con el estudio de la colocalización de los receptores de estrógeno y de neurotrofinas con sus dianas, en el cerebro (Miranda RC y cols., 1993; Toran-Allerand CD y cols., 1999). Estos descubrimientos indican que el estrógeno y los factores tróficos pueden actuar de forma coordinada en la misma neurona para regular la expresión de genes implicados en supervivencia neuronal (Toran-Allerand CD, 1996). Así pues, las vías que independientemente activan cada uno de los sistemas, pueden converger en la promoción de un mismo efecto. Además, como ya hemos visto, uno de los mecanismos de acción del estradiol, implica la activación de vías de señalización que también son reguladas por diferentes factores tróficos.

Una mención especial, merece la interacción del estradiol con el IGF-I, que al igual que el estradiol regula la supervivencia neuronal, el desarrollo y la plasticidad en la corteza cerebral (Niblock MM y cols., 2000; Popken GJ y cols., 2004; Hodge RD y cols., 2007). Muchas células del cerebro de rata coexpresan los receptores de estradiol y de IGF-I (Cardona-Gomez GP y cols., 2000b) haciendo así posible la interacción de los dos sistemas. De hecho, ambos factores interaccionan para regular una gran variedad de eventos en el tejido nervioso, incluyendo la diferenciación, la supervivencia de poblaciones específicas de neuronas, la génesis de nuevas neuronas en el cerebro adulto, la plasticidad de las sinapsis, la liberación de factores neuroendocrinos y el comportamiento reproductor (Etgen AM y cols., 2006; Mendez P y cols., 2006; Todd BJ y cols., 2007). La interacción del estradiol y el IGF-I en algunos casos va más allá y genera una dependencia entre las dos moléculas de tal manera que para desarrollar sus funciones necesita de la otra. Así, muchas acciones del estradiol en el cerebro son bloqueadas por la inhibición de la señalización del receptor de IGF-I, mientras que algunos efectos del IGF-I son bloqueados por la inhibición de la señalización de los receptores de estrógeno (Etgen AM y cols., 2006; Mendez P y cols., 2006; Todd BJ y cols., 2007). La interacción del estradiol y la señalización del IGF-I parece ser importante en la regulación de la supervivencia neuronal, y en las modificaciones de plasticidad, en el crecimiento de las prolongaciones neuronales y en la sinaptogénesis durante la pubertad.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

Partiendo de toda la información expuesta anteriormente, entre la que destacamos la capacidad del estradiol de regular las vías de la PI3K y de las MAPKs en cerebro, la importancia de los receptores de estrógeno y de IGF-I para el desarrollo de esa capacidad y las diferentes posibles procedencias del estradiol que actúa a nivel cerebral, nos planteamos analizar la regulación que el estradiol ovárico, cerebral y exógeno, ejerce sobre las vías de la PI3K y de las MAPKs en el cerebro de rata en diferentes situaciones fisiológicas.

OBJETIVOS CONCRETOS.

- Estudiar si la adaptación del cerebro de rata a la pérdida de aporte de hormonas ováricas, afecta al estado basal de las vías de señalización de la PI3K y de las MAPKs.
- Estudiar si los cambios que durante la pubertad experimenta el cerebro, afectan a la capacidad del estradiol de regular las vías de la PI3K y de las MAPKs en la corteza prefrontal de rata.
- Estudiar el efecto de una prolongada ovariectomía, de la edad y del tratamiento con estradiol, sobre la expresión de los receptores de estrógeno y de IGF-I en el cerebro de rata.
- Estudiar la implicación del estradiol exógeno y del sintetizado localmente por neuronas y astrocitos en la regulación de las vías de la PI3K y de las MAPKs, en estas células.
- Analizar la capacidad del estradiol exógeno y del sintetizado localmente por neuronas y astrocitos, de regular la activación que el IGF-I induce sobre las vías de señalización de la PI3K y de las MAPKs, en estas células.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MODELOS DE ESTUDIO

1.1 MODELO *IN VIVO*: RATAS WISTAR.

Para el desarrollo de los experimentos *in vivo*, se utilizaron siempre ratas hembra de la cepa Wistar, procedentes del animalario de la Facultad de Biología de la Universidad Complutense de Madrid. Los animales se mantuvieron a 22°C y 60 % de humedad, con ciclos alternativos de luz/oscuridad de 12h y sin restricciones de comida ni de agua. El número de los animales se redujo al mínimo necesario para cada experimento y fueron manipulados conforme a las normativas de la Unión Europea (86/609/EEC) y de España (*Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos: RD. 223/88, de 14 de Marzo, BOE*), teniendo especial cuidado en evitar su sufrimiento.

Los animales fueron tratados de acuerdo al siguiente protocolo general.

- Ovariectomía (OVX)

Con el fin de minimizar el nivel de estrógeno circulante de origen gonadal, se ovariectomizó bilateralmente a las ratas empleando halotano como anestésico (*Fluothane, AstraZeneca*).

- Tratamiento

A diferentes tiempos después de la ovariectomía, según se indica en cada uno de los diseños experimentales, los animales recibieron 17 β -estradiol (*Sigma-Aldrich*). El 17 β -estradiol se disolvió inicialmente en dimetil sulfóxido (DMSO) y posteriormente en aceite de sésamo en las concentraciones indicadas en cada caso. A los animales control se les inyectó el mismo volumen de vehículo (DMSO en aceite de sésamo) que se empleó en los tratados. La hormona se administró en una única inyección intraperitoneal, dado que es capaz de cruzar sin dificultad la barrera hematoencefálica.

- Sacrificio

Los animales fueron sacrificados 6 ó 24 horas después del tratamiento, según se indica en el diseño experimental. Los animales cuyos cerebros se procesaron por la técnica del "Western blotting", se anestesiaron parcialmente con halotano y fueron decapitados. A continuación, se les extrajo rápidamente el cerebro, se disecaron las zonas de interés (hipocampo, hipotálamo, corteza prefrontal y cerebelo en unos casos,

MATERIALES Y MÉTODOS

y sólo corteza prefrontal en otros) y se congelaron utilizando nieve carbónica. En el caso del procesamiento para inmunohistoquímicas, los animales fueron anestesiados profundamente con pentobarbital (100mg/Kg) y posteriormente perfundidos transcardialmente, hasta alcanzar la arteria aorta, 50ml de NaCl al 0,9%, seguidos por 250ml de fijador, paraformaldehído (PFA) al 4% en tampón fosfato (PB) 0,1M pH 7,4. Después, se extrajeron los cerebros y se mantuvieron en la solución fijadora de 4 a 6 horas a 4°C. Finalmente se lavaron varias veces con PB 0,1M, en el que se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su procesamiento, que nunca excedió una semana desde el sacrificio.

1.2 MODELO *IN VITRO*: CULTIVOS PRIMARIOS.

1.2.1 Astrocitos de corteza o hipocampo.

El cultivo primario de astrocitos se realizó partiendo de cerebros postnatales (P0 a P2) de hembras de rata Wistar. Se disecaron por separado los hipocampos y las cortezas, en condiciones estériles, empleando DMEM-F12 suplementado con 10% de suero fetal de ternera (FBS) como medio de aislamiento. Una vez obtenidos los tejidos de interés, se transfirieron a DMEM-F12 sin suero, donde se disgregaron mecánicamente empleando para ello pipetas Pasteur cuyo diámetro de luz fue previamente reducido a la llama. La disgregación se completó pasando el homogeneizado por una malla de nylon de 40µm. Tras una centrifugación de 5min a 400g, las células se resuspendieron en DMEM-F12 con 10% FBS y 1% de antibiótico/antimicótico (Ab/Am) y se sembraron en placas de 75cm² a razón de, las cortezas de un animal o los hipocampos de dos animales. Una vez que los astrocitos alcanzaron la confluencia, se agitaron a 280rpm durante 16h para eliminar la población celular de oligodendrocitos y microglía. Una vez purificados, los astrocitos se sembraron en placas recubiertas con Poly-L-lisina a la densidad adecuada para la realización de los experimentos.

1.2.2 Neuronas de corteza.

Para el cultivo primario de neuronas se utilizaron embriones de rata Wistar de 17 días de gestación (E17). La corteza cerebral se disecó en PBS 0,01M, en condiciones de esterilidad. Una vez obtenido el tejido, se troceó con unas tijeras y posteriormente se sometió a una digestión enzimática con 0,1mg/ml de tripsina en tampón fosfato salino (PBS) 0,01M, durante 10min, a 37°C. Tras la interrupción de la reacción, añadiendo DMEM-F12 con 10% de FBS, se terminó la disgregación pasando

el homogeneizado por una malla de nylon de 40µm. Finalmente las células se centrifugaron durante 5min a 400g, se resuspendieron en medio Neurobasal, suplementado con B27 y glutamina, además de con 1% de Ab/Am y se sembraron en placas recubiertas con Poly-L-lisina, a la densidad adecuada para la realización de los experimentos. A los cuatro días se cambió la mitad del volumen del medio para reponer los nutrientes, sin eliminar completamente los factores sintetizados por las neuronas.

El medio de cultivo empleado en todo momento, carecía de rojo fenol, para evitar la actividad estrogénica que presenta dicha sustancia (Berthois Y y cols., 1986).

2. TECNICAS UTILIZADAS

2.1 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS

- De tejido.

Para su posterior procesamiento mediante “Western blotting”, el tejido se homogeneizó en el tampón de lisis adecuado: 20mM Tris-HCl pH 7,4; 150mM NaCl, 10% glicerol, 5mM EDTA y 1% Nonidet P-40 (*Roche*). Además se añadieron inhibidores de proteasas (50µg/ml PMSF, 25µg/ml leupeptina y 10µg/ml aprotinina, todos de *Sigma*) y un inhibidor de fosfatasa (100nM ortovanadato sódico, *Sigma*). Para homogeneizar el cerebelo o el hipocampo se emplearon 1,5ml de dicho tampón y para la corteza prefrontal o el hipotálamo, 1 ml. Con ayuda de un motor se realizó la homogeneización en frío y tras 15min reposando en hielo, se centrifugaron las muestras a 21000g durante 15min. La concentración de proteínas del sobrenadante fue evaluada utilizando un ensayo Bradford modificado (*Bio-Rad*) por cuantificación colorimétrica a 595nm en un espectrofotómetro.

- De cultivos celulares.

En el caso de los cultivos primarios, a fin de no diluir la muestra, las células fueron lisadas directamente con el tampón de carga (15mM TrisHCl pH 6,5; 2% dodecilo sulfato sal sódica SDS, *Sigma*; 10% glicerol; azul de bromofenol y 100mM ditiotritol (DTT), *Sigma*). El extracto obtenido fue sonificado, para conseguir extraer totalmente el contenido del núcleo celular.

MATERIALES Y MÉTODOS

El tampón de lisis empleado, permite obtener un alto rendimiento de extracción, pero impide la cuantificación de la proteína presente en la muestra. Así pues para poder estimar la concentración obtenida en los experimentos, se realizó uno en paralelo, en el que se empleó la misma densidad celular, pero en el que la lisis se realizó con el mismo tampón empleado en tejido, que sí permite la posterior cuantificación con un ensayo Bradford.

2.2 ELECTROFORESIS Y WESTERN BLOTTING

Esta técnica nos permite cuantificar la cantidad de una proteína que nos interese, a partir de una mezcla compleja: los homogenizados de tejido o de los cultivos celulares.

En nuestro caso, se empleó un equipo de electroforesis para geles de pequeño tamaño (*Bio-Rad*) y un tampón de electroforesis de tris-glicina (25mM TrisHCl pH 8,3; 192mM glicina y 0,1% SDS). Las alícuotas de proteína (50µg para muestras obtenidas de tejido y 60µg para aquellas procedentes de cultivos celulares) se desnaturalizaron usando tampón de carga y se calentaron durante 5 minutos a 95°C antes de cargarse en el gel. El porcentaje de acrilamida/bisacrilamida que determina el tamaño del poro, se ajustó al peso molecular de la proteína que se fuera a detectar en cada caso. Junto a las muestras se cargó un marcador de peso molecular de rango amplio (6,5-180KDa, *New England Biolabs*).

Tras su separación electroforética, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa usando tampón de transferencia (25mM TrisHCl pH 8,3; 192mM glicina y 0,02% SDS) y un equipo de transferencia sumergida (*Bio-Rad*).

La membrana se lavó brevemente con agua destilada y se marcó todo el patrón de proteínas con rojo Ponceau (Rojo Ponceau al 0,1%, *Sigma*, en ácido acético al 5%) para poder recortar las membranas a la altura de las diferentes proteínas a estudiar. Los trocitos de membrana se incubaron con una solución de leche desnatada en polvo al 5% en Tampón de Tris-HCl salino con Tween-20 (TTBS: 20mM Tris HCl; 137mM NaCl, pH 7,5 y 0,05% Tween-20, *Sigma*) para bloquear los sitios de unión inespecíficos. La incubación con el anticuerpo primario se realizó durante un mínimo de una noche a 4°C en TTBS. Se utilizaron los anticuerpos detallados en la tabla 1, a las diluciones indicadas.

Tras tres lavados con TTBS, la membrana se incubó durante 2h a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (1:10.000, *Bio-Rad*), contra conejo o contra ratón, según correspondiera en cada caso. Después de tres

lavados con TBS (Tampón de Tris-HCl salino), se detectó la unión del anticuerpo usando una solución quimioluminiscente comercial (ECL de *GE Healthcare-Amersham*) y películas fotosensibles. Éstas fueron reveladas inmediatamente usando una maquina reveladora automática (*Curix 60, Agfa*).

Tabla 1. Especificidad, especie de obtención, dilución de uso y fabricante de los anticuerpos primarios utilizados en el "Western blotting".

ANTÍGENO	ESPECIE	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Receptor de estrógenos alfa (ER α)	Conejo	(1:1000)	Santa Cruz Biotech
Receptor de estrógenos beta (ER β)	Conejo	(1:1000)	Zymed
Subunidad β del receptor de IGF-I, (IGF-IR β)	Conejo	(1:2000)	Santa Cruz Biotech
Subunidad p85 de PI3K	Conejo	(1:4000)	Instituto Cajal, Dr. Sebastian Pons
GSK3 β	Ratón	(1:2000)	BD Transduction Labs
Serina 9 GSK3 β fosforilada (P-GSK3 β)	Conejo	(1:1000)	Cell Signaling
Akt 1/2	Conejo	(1:2000)	Santa Cruz Biotech
Serina 473 Akt fosforilada (P-Akt)	Conejo	(1:1000)	Cell Signaling
P42 y p44 fosforiladas (P-ERK1/2)	Conejo	(1:1000)	Cell Signaling

Las películas fotográficas resultantes fueron escaneadas y las bandas cuantificadas en un densitómetro modelo GS-800 acoplado a un ordenador con un programa de cuantificación de imágenes "Quantity one" versión 4.6.1 (*Bio-Rad*).

Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando la proteína p85 como control de carga, excepto para Akt y GSK3 β fosforilados, para los que se emplearon Akt o GSK3 β totales. Finalmente, en las gráficas los resultados se expresaron como porcentajes relativizados a los valores del grupo control. Para minimizar las variaciones entre los diferentes ensayos de electroforesis, las muestras de todos los grupos experimentales se procesaron en paralelo.

2.3 INMUNOHISTOQUÍMICA. Revelado con Diaminobencidina o fluorescencia

Con esta técnica se puede detectar la localización tisular y celular de la expresión de una proteína, así como su correlación con los parámetros morfológicos.

Para ello se incubaron secciones provenientes de cerebros previamente perfundidos con paraformaldehído. Los cortes coronales de corteza prefrontal, de un grosor de 30 μ m, se obtuvieron con un Vibratomo (*VT1000S, Leica Microsystems*). La inmunohistoquímica se realizó sobre cortes en flotación sometidos a una agitación moderada.

MATERIALES Y MÉTODOS

El protocolo seguido para la **inmunohistoquímica de revelado con diaminobencidina (DAB)** es el siguiente.

Para lavar, se empleó una solución de PB 0,1M pH 7,4; 0,3% de BSA, *Sigma* y 0,3% de Tritón X-100, *Sigma*, (PBT-BSA). La peroxidasa endógena se bloqueó incubando los cortes 10 minutos con 30% de metanol y 0,9% de peróxido de hidrógeno en PB 0,1M. Posteriormente, se incubaron con el anticuerpo primario, disuelto en PBT-BSA, adicionado con suero normal de cabra (NGS, *Sigma*) a una concentración final del 3%, durante 24 ó 48h, a 4°C. Los anticuerpos y las diluciones utilizadas se detallan en el apartado A de la tabla 2. Tras lavar abundantemente, las secciones se incubaron con el anticuerpo secundario generado en cabra y conjugado con biotina (Tabla 2 apartado B) a una dilución de 1:300, durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, los cortes fueron incubados con el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC; *PIERCE*) diluido 1:500 en PBT-BSA, durante hora y media, a temperatura ambiente. Finalmente se procedió al revelado de la actividad peroxidada, incubando los cortes con una solución de 0,01% de peróxido de hidrógeno en PB 0,1M, con 0,03% de diaminobencidina (DAB; *Sigma*) como cromógeno.

Los cortes se observaron en un microscopio de luz transmitida (*Leica DMRB-E*)

Tabla 2. Especificidad, especie de obtención, dilución de uso y fabricante de los distintos anticuerpos utilizados para la inmunohistoquímica.

A	ANTÍGENO	ESPECIE	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
	Receptor de estrógenos alfa (ER α)	Conejo	(1:600)	Santa Cruz Biotech
	Subunidad β del receptor de IGF-I, (IGF-IR β)	Conejo	(1:100)	Santa Cruz Biotech
B	Anti-conejo biotinado	Cabra	(1:300)	Thermo Scientific
	Anti-ratón biotinado	Cabra	(1:300)	Thermo Scientific
C	Anti-conejo Alexa 488 (verde)	Cabra	(1:1000)	Molecular Probes
	Anti-ratón Alexa 594 (rojo)	Cabra	(1:1000)	Molecular Probes

El protocolo seguido para la **inmunohistoquímica de fluorescencia** es similar, si bien se omite la inhibición de la peroxidasa endógena, por ser innecesaria. Los anticuerpos secundarios, generados en cabra, estaban conjugados con fluoróforos rojos o verdes (alexas) y se emplearon a una dilución de 1:1000 (Tabla 2 apartado C).

Los cortes se observaron en un microscopio de fluorescencia (*Leica DM600B*)

2.4 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

El número de células inmunorreactivas para ER α e IGF-IR se estudió en las capas II/III de la subdivisión dorsal de la corteza cingular anterior y en las capas II/III del área prelímbica, aproximadamente en el nivel anteroposterior correspondiente al indicado por las coordenadas +3,7mm de bregma, de acuerdo con el atlas estereotáxico de cerebro de rata de Paxinos y Watson (1998). El número de células inmunorreactivas en las secciones reveladas con DAB fue estimado por el método del disector óptico (Reed MG y Howard CV, 1998) usando el grosor total de la sección como altura del disector (Hatton WJ y von Bartheld CS, 1999) y un visor de recuento de 220 x 220 μ m para los conteos de células positivas. Un total de 10 campos fueron cuantificados para cada animal. El grosor de los cortes se midió utilizando un calibrador digital de grosor (Microcator, *Heidenhain-Metro MT 12/ND221*) acoplado a un microscopio óptico (*Leitz LABORLUX S*). Se contaron los núcleos de las células inmunoreactivas que se iban visualizando en foco al subir y bajar la pletina del microscopio y que se encontraban dentro del campo del disector. Todos los recuentos se realizaron en secciones codificadas en las que no estaba identificado el grupo experimental.

2.5 INMUNOCITOQUÍMICA DE FLUORESCENCIA

Se emplea esta técnica cuando se pretende demostrar la presencia o no de una proteína en un determinado tipo celular y cuál es su localización subcelular aproximada.

Para ello se utilizaron, cultivos celulares sembrados sobre cubres previamente recubiertos con Poly-L-lisina a 50 μ g/ml. Dado que se quería apreciar la morfología de las células, la siembra se realizó a baja densidad. Una vez terminados los tratamientos, los cubres se lavaron varias veces con PBS, antes de proceder a la fijación de las células con paraformaldehído al 4% en PB 0,1M pH 7,4, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras el tiempo de fijación, se procedió a lavar abundantemente con PBS 0,01M para eliminar completamente los restos de PFA. En este punto, las células ya están listas para el procesamiento inmunocitoquímico.

En este caso, el tampón que se empleó estaba compuesto por: PB 0,1M pH 7,4; 0,1% de BSA y 0,1% de Tritón X-100 (PBT-BSA-0,1). Tras permeabilizar con el tampón, las células se incubaron con el anticuerpo primario disuelto en PBT-BSA-0,1

MATERIALES Y MÉTODOS

con NGS al 3%, durante un periodo de 24h a 4°C. Los anticuerpos y las diluciones utilizadas se detallan en el apartado A de la tabla 3. Tras lavar abundantemente, se incubó 2 horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios generados en cabra y conjugados con fluoróforos rojos o verdes, a una dilución de 1:1000 (Tabla 3 apartado B). Posteriormente, a fin de visualizar los núcleos de las células, los cultivos fueron incubados durante 30 minutos con el colorante nuclear DAPI (*Calbiochem*). Los cubres con las células se montaron sobre portas, empleando el medio de fluorescencia Gerbatol y se observaron en el microscopio de fluorescencia (*Leica DM600B*).

Tabla 3. Especificidad, especie de obtención, dilución de uso y fabricante de los distintos anticuerpos utilizados para la inmunocitoquímica.

A	ANTÍGENO	ESPECIE	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
	Receptor de estrógenos alfa (ER α)	Conejo	(1:500)	Santa Cruz Biotech
	Receptor de estrógenos beta (ER β)	Pollo	(1:250)	Abcam
	Subunidad β del receptor de IGF-I, (IGF-IR β)	Conejo	(1:250)	Santa Cruz Biotech.CA
	Aromatasa	Conejo	(1:2000)	Instituto Cajal, Dr. Iñigo Azcoitia
	GFAP	Ratón	(1:1000)	Sigma-Aldrich
	β III- tubulina	Ratón	(1:10000)	Promega Corporation
B	Anti-conejo Alexa 488 (verde)	Cabra	(1:1000)	Molecular Probes
	Anti-ratón Alexa 594 (rojo)	Cabra	(1:1000)	Molecular Probes

2.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis estadístico de los datos hemos utilizado el programa informático Sigma STAT 2.0. El nivel de significación estadística se estableció siempre en valores de p menores de 0,05. Hemos aplicado diferentes pruebas estadísticas en función del diseño experimental. En primer lugar, se procedió a comprobar la homogeneidad de las varianzas, para determinar el tipo de análisis posterior. Debido a que las varianzas resultaron ser no homogéneas, para las comparaciones múltiples se utilizó la prueba no paramétrica de Krustal-Wallis y posteriormente como post-hoc, el test de Dunn para estudiar la significancia entre pares de grupos. Para los ensayos en los que únicamente se compararon dos grupos experimentales, se utilizó el test de Mann-Whitney.

Los datos se expresan en todos los casos como el valor de la media y las barras de error representan el error estándar de la media. La n utilizada para los

análisis estadísticos fueron los animales incluidos en los estudios *in vivo* o el número de replicas realizadas en experimentos independientes en los estudios *in vitro*.

3. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 EXPERIMENTOS *IN VIVO*

3.1.1 Estudio del efecto de la ausencia de hormonas gonadales, debido a la ovariectomía, sobre las vías de señalización de la PI3K y las MAPKs en cerebro de ratas hembra.

En este estudio, queríamos ver si la duración del periodo transcurrido tras la ovariectomía, modifica el estado basal de las vías de señalización de la PI3K y de las MAPKs. Para ello, empleamos ratas hembra Wistar de dos meses de edad a las que ovariectomizamos y sacrificamos a dos tiempos diferentes tras la operación, 10 ó 30 días, mediante decapitación.

Así pues, en un primer lugar tenemos dos grupos experimentales; el formado por las ratas OVX con 60 días, P60, y sacrificadas 10 días después, P70, (Fig 6, grupo 60/70) y el formado por las ratas operadas también con dos meses, P60, pero sacrificadas 30 días después, P90 (Fig 6, grupo 60/90).

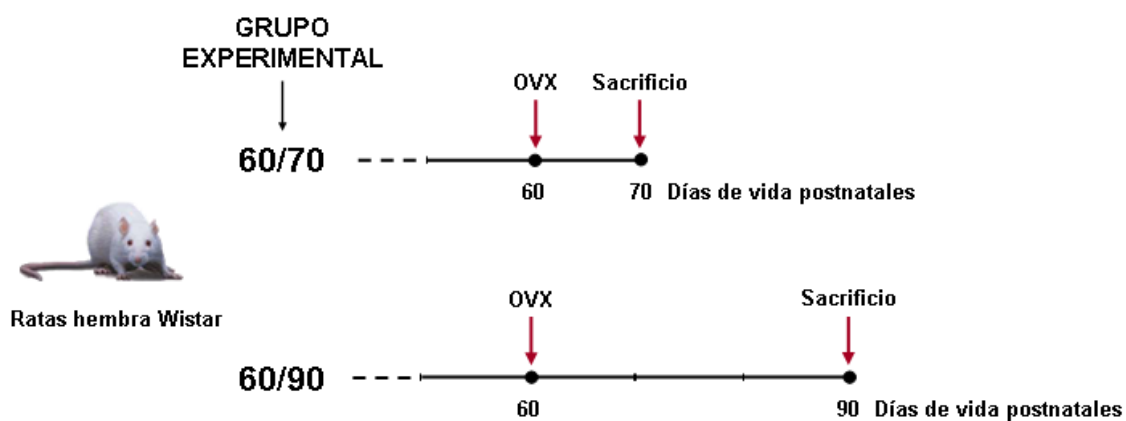


Figura 6. Esquema del protocolo seguido para los grupos 60/70 y 60/90. Cuando contaban con dos meses de edad, las ratas fueron ovariectomizadas (OVX) bilateralmente y sacrificadas tras un periodo de 10 ó 30 días.

El análisis de estos dos grupos, planteaba un problema, ya que no sólo se diferenciaban en el tiempo transcurrido tras la OVX, sino que también presentaban

MATERIALES Y MÉTODOS

diferente edad de sacrificio. Por ello, para poder descartar un posible efecto de la edad a la que los animales fueron sacrificados, hicimos un tercer grupo experimental. En este caso las ratas fueron ovariectomizadas a 80 días después de su nacimiento (P80) y sacrificadas a los diez días (P90) (Fig 7, grupo 80/90). Así el tiempo transcurrido tras la OVX es igual al del grupo 60/70, 10 días, y la edad de sacrificio igual a la del grupo 60/90.

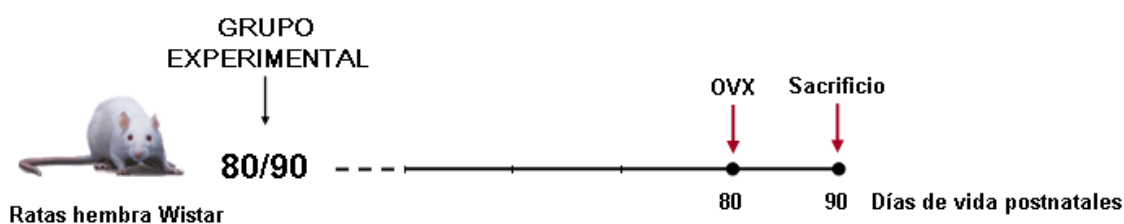


Figura 7. Esquema del protocolo seguido para el grupo 80/90. Cuando contaban con 80 días de edad, las ratas fueron ovariectomizadas (OVX) bilateralmente y 10 días después, sacrificadas.

La n empleada fue de 5 animales por grupo experimental.

3.1.2 Estudio del efecto de la madurez sexual en la capacidad del estradiol de activar las vías de señalización de la PI3K y las MAPKs en corteza prefrontal de ratas hembra

En este caso, al querer analizar el efecto de la maduración sexual, trabajamos con ratas hembra Wistar ovariectomizadas antes o después de la pubertad.

Para el primer grupo, se ovariectomizaron diez ratas post-puberales, con 50 días de vida postnatal. Diez días después de la operación y 24 horas antes de su sacrificio, la mitad del grupo fue tratado con 17β -estradiol (veansé más abajo las dosis) y la otra mitad con su vehículo (DMSO en aceite de sésamo) (Fig 8, grupo 50/61).

Para el segundo grupo, se ovariectomizaron 10 ratas de un mes de edad, esta vez antes de que alcanzar la madurez sexual. Después, a la misma edad que en el grupo anterior, es decir, a los 60 días de vida, fueron tratadas con estradiol (5 animales) o su vehículo (5 animales). Tras 24 horas, fueron sacrificadas (Fig 8, grupo 30/61).

Finalmente, en un intento de descartar que el efecto observado fuese debido a la diferencia en el tiempo transcurrido tras la operación, hicimos un tercer grupo. En este caso 10 ratas fueron ovariectomizadas al mes de vida, nuevamente antes de alcanzar la madurez sexual. Posteriormente, diez días después de la operación, igual que en el primer grupo, fueron tratadas con la hormona (5 animales) o su vehículo (5 animales) y sacrificadas 24 horas después (Fig 8, grupo 30/41).

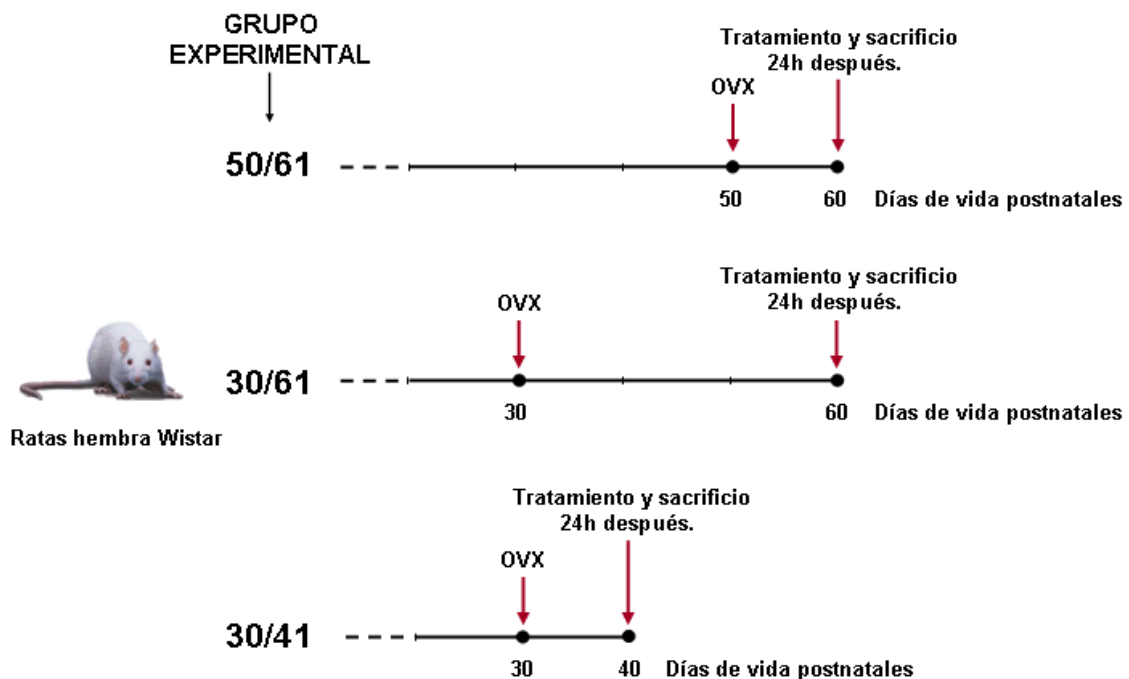


Figura 8. Esquema del tratamiento realizado a las ratas Wistar para los experimentos de bioquímica e inmunohistoquímica. Las ratas fueron ovariectomizadas (OVX) bilateralmente, a la edad indicada en cada caso. Tras un periodo de recuperación de 10 ó 30 días, fueron tratadas con 17β -estradiol o su vehículo y sacrificadas 24h después.

Para los tratamientos, el 17β -estradiol se disolvió en DMSO hasta una concentración de 60mg/ml y posteriormente en aceite de sésamo para llevarlo hasta una concentración final de 600 μ g/ml. La inyección intraperitoneal de 0,5ml de esta solución proporcionó la dosis deseada: 300 μ g por animal. Esta dosis genera, durante 24h, niveles de hormona en plasma superiores a los que fisiológicamente se dan en proestro. La concentración en sangre de la hormona inyectada comienza a disminuir a partir de las 48 horas (Shull JD y Gorski J, 1989). Así mismo, existen trabajos que demuestran que, dicha dosis, es capaz de inducir la fosforilación de Akt y de GSK3 β en el cerebro de ratas ovariectomizadas (Cardona-Gomez GP y cols., 2002b, 2004). Los animales control fueron inyectados con el mismo volumen de vehículo (DMSO en aceite de sésamo).

3.1.3 Expresión de los receptores de IGF-I y estrógenos en el cerebro de rata, en relación a la edad, la ovariectomía y el tratamiento con estradiol

Para el desarrollo del siguiente estudio, se emplearon los animales control del grupo 60/90 descrito anteriormente y 20 ratas hembra Wistar de 18 meses de edad repartidas en dos grupos experimentales.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el primero de ellos, se ovariectomizó a 10 ratas con 17 meses de edad, que recibieron 17β -estradiol (5 animales) o su vehículo (5 animales) al cabo de un mes. Seis horas después del tratamiento, las ratas fueron sacrificadas mediante decapitación (Fig 9, grupo A).

En el segundo, las ratas fueron ovariectomizadas con 2 meses de edad. Posteriormente, para igualar las condiciones post-operatorias del primer grupo, a los 17 meses de edad fueron sometidas a una falsa ovariectomía. Un mes después fueron tratadas con 17β -estradiol (5 animales) o su vehículo (5 animales) para finalmente ser sacrificadas mediante decapitación 6 horas después de los tratamientos (Fig 9, grupo B)

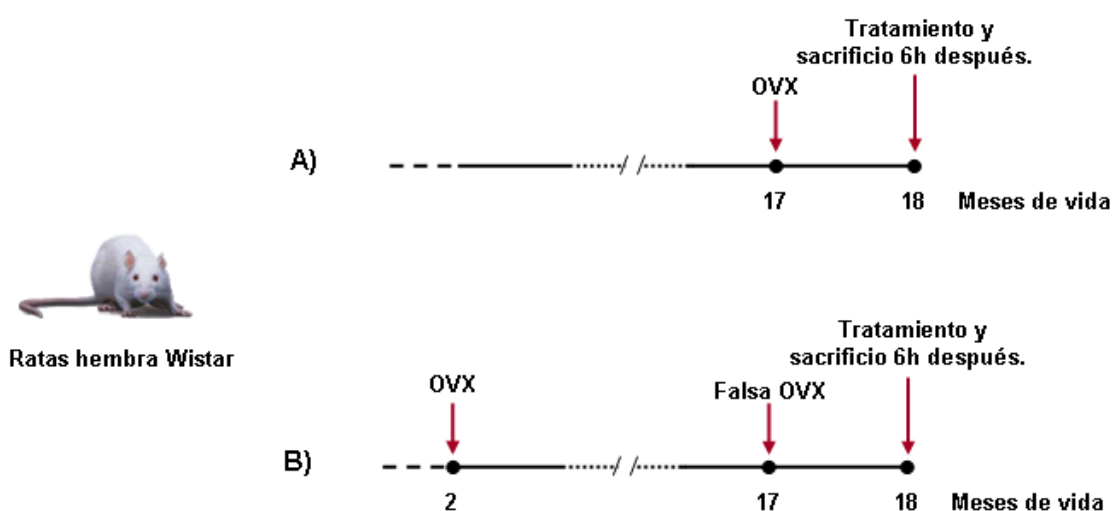


Figura 9. Esquema del protocolo seguido con las ratas viejas Wistar que recibieron un tratamiento agudo de 17β -estradiol. **A)** Ratas ovariectomizadas con 17 meses y tratadas con 18 meses. **B)** Ratas ovariectomizadas con 2 meses y tratadas con 18 meses.

En este caso, para los tratamientos, el 17β -estradiol se disolvió en DMSO hasta una concentración de 14,3mg/ml y posteriormente en aceite de sésamo hasta llevarlo a una concentración final de 142,9 μ g/ml. La inyección intraperitoneal de 0,14ml de esta solución, proporcionó la dosis deseada: 20 μ g por animal. Los animales control fueron inyectados con el mismo volumen de vehículo (DMSO en aceite de sésamo).

3.2 EXPERIMENTOS *IN VITRO*

3.2.1 Diseño experimental para astrocitos

Una vez obtenidos los astrocitos, siguiendo el protocolo indicado anteriormente, se procedió a trabajar con ellos de la siguiente manera.

Para los estudios realizados mediante “Western blotting”, se necesitó una densidad próxima a la confluencia de 31500 células/cm² (c/cm²). Los astrocitos purificados fueron sembrados sobre placas recubiertas con Poly-L-lisina (10 µg/ml) una vez resuspendidos en DMEM-F12 con 1% Ab/Am y 10% de FBS tratado con carbón activado y dextrano (*Hyclone*). Este tratamiento reduce a niveles mínimos el contenido en hormonas esteroides (y algunos factores de crecimiento) en el suero, lo cual es necesario en estudios relacionados con la actividad de estas hormonas.

Al día siguiente al subplaqueo, los astrocitos se pusieron en ayuno. Para ello se les retiró completamente el medio, eliminando los factores tróficos sintetizados por ellos, y se repuso con medio sin suero. Esta situación de ayuno se mantuvo durante tres horas. Una vez transcurrido este tiempo, se reemplazó el medio por medio nuevo. Este nuevo cambio se realizó a fin de eliminar posibles factores sintetizados endógenamente por las células, durante las tres horas del ayuno, que pudieran interactuar con el tratamiento. Tras 30 minutos de reposo, se procedió a la aplicación de los tratamientos de corta duración (20 minutos) antes de lisar las células.

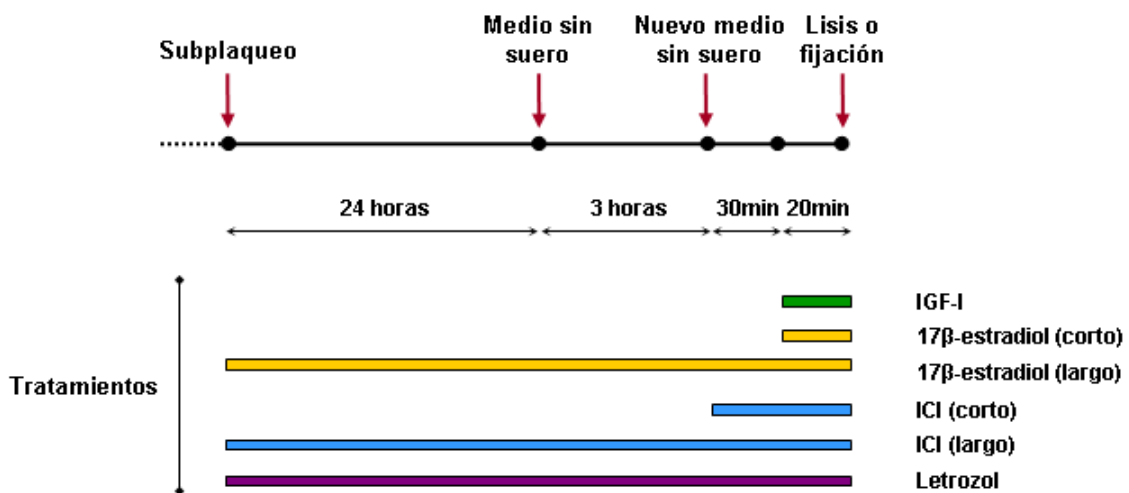


Figura 10. Esquema de los tratamientos aplicados a los astrocitos para los experimentos de bioquímica e inmunocitoquímica.

Tratamientos (Fig 10):

- De corta duración, durante los 20 minutos antes de lisar las células.

IGF-I (*Gro-Pep*) a una concentración final de 10nM.

MATERIALES Y MÉTODOS

17 β -estradiol a una concentración final de 10nM.

- Pretratamiento de inhibición. Se inicia el tratamiento 30 minutos antes de la aplicación del tratamiento de corta duración.

ICI182780 (*Sigma-Aldrich*) a una concentración final de 100nM. El ICI182780 es un antagonista de los receptores de estrógeno.

- De larga duración, las 28 horas que dura el experimento. En este caso el tratamiento comienza en cuanto se subplaquean los astrocitos y se repone con cada cambio de medio.

17 β -estradiol a una concentración final de 10nM.

Letrozol (*Novartis*) a una concentración final de 1nM las primeras 24h de tratamiento y de 10nM desde entonces hasta el final del experimento. El letrozol es un inhibidor selectivo de la aromatasa (estradiol sintetasa).

ICI182780 a una concentración final de 100 nM.

Cada experimento se repitió un mínimo de 4 veces.

Para los estudios realizados mediante inmunocitoquímica se recurrió a una baja densidad celular, 20000c/cm², para poder apreciar la morfología de las células. En este caso, los astrocitos fueron sembrados, en DMEM-F12 con 1% Ab/Am y 10% de FBS tratado con carbón activado y dextrano, sobre cubres de 12mm de diámetro recubiertos con Poly-L-lisina (50 μ g/ml).

El protocolo seguido una vez sembrados es idéntico al descrito anteriormente, aunque en este caso, sólo se utilizaron los tratamientos de larga duración y el de IGF-I.

Una vez terminados los tratamientos, las células no son lisadas sino fijadas con PFA, como se describe en el apartado de inmunocitoquímica.

Cada experimento se repitió 3 veces.

3.2.2 Diseño experimental para neuronas

Las neuronas se dejaron crecer durante 8 días, para que alcanzaran un elevado grado de diferenciación, y después, se procedió a trabajar con ellas de la siguiente manera.

Para los estudios realizados mediante "Western blotting", se necesitó una densidad próxima a la confluencia de 131500c/cm². Las neuronas fueron sembradas sobre placas recubiertas con Poly-L-lisina (10 μ g/ml) y a los cuatro días se les cambió la mitad del medio por medio fresco.

A los ocho días de ser sembradas se las puso a ayunar, para lo que se retiró todo el medio y se añadió Neurobasal con 1% de Ab/Am. En esta situación de ayuno se las dejó durante tres horas. Una vez transcurrido este tiempo, se reemplazó el medio y tras 30 minutos de reposo se procedió a la aplicación de los tratamientos de corta duración durante 20 minutos antes de lisar las neuronas.

Tratamientos (Fig 11):

- De corta duración, durante los 20 minutos antes de lisar las células.

IGF-I a una concentración final de 10nM.

17 β -estradiol a una concentración final de 10nM.

- Pretratamiento de inhibición. Se inicia el tratamiento 30 minutos antes de la aplicación del tratamiento de corta duración.

ICI182780 a una concentración final de 100nM.

- De larga duración, las 28 horas que dura el experimento. En este caso el tratamiento comienza 24h antes de poner a las neuronas a ayunar y se repone con cada cambio de medio.

17 β -estradiol a una concentración final de 10nM.

Letrozol a una concentración final de 1nM las primeras 24h de tratamiento y de 10nM desde entonces hasta el final del mismo.

ICI182780 a una concentración final de 100nM.

Cada experimento se repitió un mínimo de 4 veces.

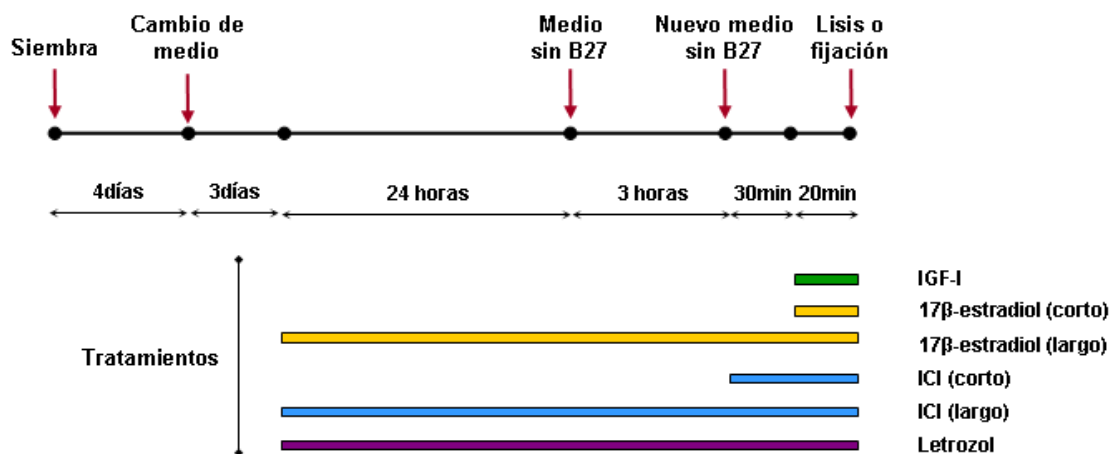


Figura 11. Esquema de los tratamientos aplicados a las neuronas para los experimentos de bioquímica e inmunocitoquímica.

Para los estudios realizados mediante inmunocitoquímica se recurrió a una baja densidad celular, 21000c/cm², para poder apreciar la morfología de las células.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este caso, las neuronas fueron sembradas sobre cubres de 12mm de diámetro recubiertos con Poly-L-lisina (50µg/ml).

El protocolo seguido es idéntico al descrito anteriormente, aunque en este caso, sólo se utilizaron los tratamientos de larga duración y el de IGF-I.

Una vez terminados los tratamientos, las células no son lisadas sino fijadas con PFA, como se describe en el apartado de inmunocitoquímica.

Cada experimento se repitió 3 veces.

RESULTADOS

1 EFECTO DE LA AUSENCIA DE HORMONAS GONADALES, DEBIDO A LA OVARIECTOMÍA, SOBRE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA PI3K Y DE LAS MAPKS EN EL CEREBRO DE RATA HEMBRA

Teniendo en cuenta la ya comentada capacidad del estradiol de intervenir en la regulación de las vías de señalización que controla el receptor de IGF-I y que la ovariectomía supone una importante pérdida de aporte hormonal externo para el cerebro, nos planteamos el siguiente estudio.

Quisimos analizar, cómo en el proceso de reequilibrio que experimenta el organismo de una rata a la que se le han extraído los ovarios, evolucionaba, a corto plazo, el estado basal que en el cerebro, presentan las vías de señalización reguladas por el receptor de IGF-I.

1.1 EFECTO DEL PASO DEL TIEMPO TRAS LA OVARIECTOMÍA.

En este primer estudio, nos centramos en observar si ante pequeñas diferencias en el tiempo transcurrido tras la ovariectomía, se veían cambios en los niveles de activación de las vías de la PI3K y de las MAPKs. Para ello empleamos ratas hembra Wistar que fueron ovariectomizadas una vez alcanzada la madurez sexual (2 meses de edad) y a las que se sacrificó a dos tiempos tras la ovariectomía: 10 días o 30 días. Generamos así dos grupos experimentales: el 60/70, en el que tras la ovariectomía transcurren 10 días y el 60/90 en el que transcurren 30 días. De cada grupo experimental se analizaron cuatro regiones cerebrales: hipocampo, hipotálamo, corteza prefrontal y cerebelo.

En un intento por facilitar el entendimiento de los resultados obtenidos, se presentan por separado los resultados de cada una de las dos vías estudiadas: la de la PI3K y la de las MAPKs.

1.1.1 Vía de la PI3K

Para el estudio de activación de dicha vía, se analizaron mediante Western blotting los niveles de fosforilación de Akt y de GSK3 β . En el caso de Akt, el residuo fosforilado que se detecta es la serina 473. La fosforilación de dicha serina es un indicativo del estado de activación de la proteína (Alessi DR y cols., 1996). Para GSK3 β , se analizó el nivel de fosforilación de la serina 9. En este caso, la fosforilación de dicho residuo, conlleva la inhibición de la proteína (Sutherland C y cols., 1993).

RESULTADOS

Así pues, al comparar el nivel de fosforilación de Akt en ratas que llevaban 10 días ovariectomizadas, con los de ratas que llevaban 30 días ovariectomizadas, no se observaron cambios en ninguna de las cuatro regiones cerebrales estudiadas (Fig 12).

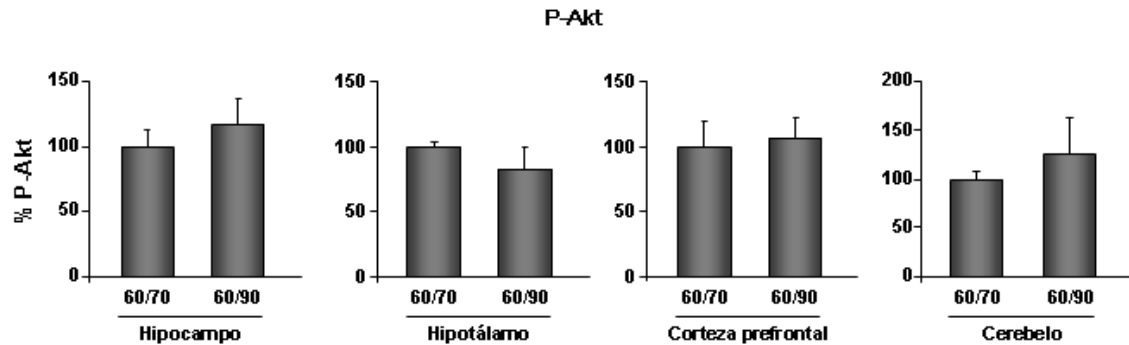


Figura 12. Efecto del tiempo sin hormonas gonadales debido a la OVX, sobre el estado de activación de Akt en animales castrados con 2 meses. No hubo cambios en el nivel de fosforilación de Akt como consecuencia de un mayor o menor tiempo transcurrido tras la OVX en ninguna de las 4 regiones cerebrales estudiadas. 60/70: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 10 días; 60/90: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 30 días.

En la vía de la PI3K, Akt es una de las proteínas que se encuentra por encima de GSK3 β , y por lo tanto, que la regula. Así pues, del mismo modo que se vio con el nivel de fosforilación de Akt, sería de esperar que no hubiera diferencias en el nivel de fosforilación de GSK3 β , al comparar entre los grupos 60/70 y 60/90. Sin embargo, esta correlación de resultados, sólo se mantuvo en el caso del hipocampo y la corteza prefrontal. En hipotálamo, el nivel de fosforilación de GSK3 β fue mayor en el grupo 60/90 que en el 60/70. Sin embargo, en el cerebelo, ocurrió lo contrario: el grupo 60/90 mostró un menor nivel de fosforilación de GSK3 β que el grupo 60/70 (Fig 13).

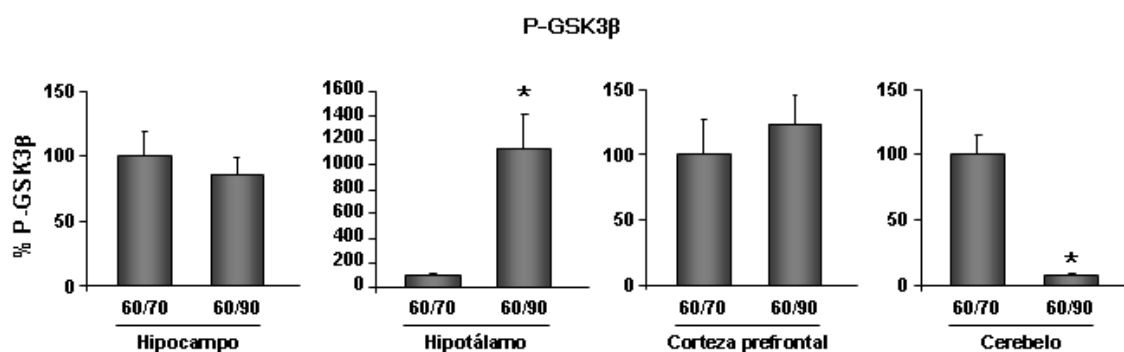


Figura 13. Efecto del tiempo sin hormonas gonadales debido a la OVX, sobre la inactivación de GSK3β en animales castrados con 2 meses. No hubo cambios en el nivel de fosforilación de GSK3β ni en el hipocampo ni en la corteza prefrontal. En el hipotálamo hubo un incremento en el grupo 60/90 con respecto al grupo 60/70. En el cerebelo, por el contrario, se observó una disminución en el nivel de fosforilación de GSK3β en el grupo 60/90. 60/70: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 10 días; 60/90: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 30 días. * $P < 0,05$ vs 60/70 (Test de Mann-Whitney).

Como se puede ver en la tabla 4 que sigue a continuación, al comparar los grupos 60/90 y 80/90 no se encontraron diferencias significativas en el nivel de fosforilación de Akt, en ninguna de las regiones cerebrales. Por el contrario, el nivel de fosforilación de GSK3β sí mostró diferencias significativas en el hipotálamo y el cerebelo, mientras que permaneció constante en el hipocampo y la corteza prefrontal.

Tabla 4. Resumen de los cambios observados debido al paso del tiempo tras la ovariectomía en los niveles de fosforilación de Akt y de GSK3β en animales ovariectomizados con 2 meses de edad. En cada casilla se indica el número de veces en las que se modifica el nivel de fosforilación de las quinasas en los animales con 30 días de OVX, en comparación con los animales con 10 días. Los incrementos se marcan en rojo y las disminuciones en verde. Las celdas se destacan en gris cuando las diferencias alcanzan la significación estadística ($p < 0,05$).

	P-Akt	P-GSK3β
Hipocampo	1,17	1,16
Hipotálamo	1,2	11,33
Corteza prefrontal	1,06	1,24
Cerebelo	1,25	13,54

1.1.2 Vía de las MAPKs

El estado de activación de esta vía se estudió analizando los niveles de fosforilación de ERK1 y de ERK2. En este caso, el residuo fosforilado que se detectó fue la treonina 202 para ERK1 y la tirosina 204 para ERK2. En ambas proteínas, la

RESULTADOS

fosforilación conlleva su activación y, por consiguiente, la de la vía de señalización de la que forman parte (Charest DL y cols., 1993; Schramek H y cols., 1997). Ambas proteínas suelen activarse o inactivarse paralelamente, pero no siempre.

En este primer análisis en el que se compararon los niveles de fosforilación de ERK1 y ERK2 en ratas ovariectomizadas con dos meses y sacrificadas a los 10 días o a los 30 días, se observaron cambios significativos en el hipocampo, el hipotálamo y la corteza prefrontal. En el hipotálamo y la corteza prefrontal, se observó un incremento en el nivel de fosforilación de ERK1/2 en el grupo 60/90. En el hipocampo hubo un incremento en el mismo grupo experimental, pero que sólo afectó al nivel de fosforilación de ERK1. Finalmente, en el cerebelo, no se observaron cambios entre los dos grupos experimentales (Fig 14).

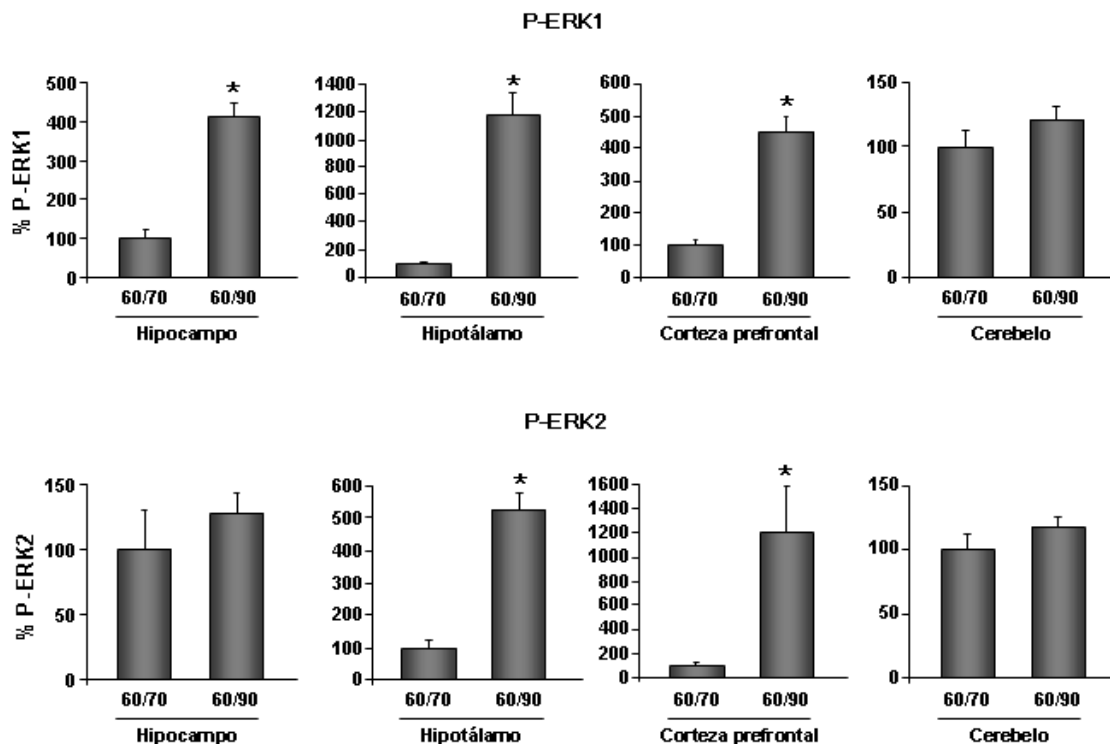


Figura 14. Efecto del tiempo sin hormonas gonadales debido a la OVX, sobre la vía de las MAPKs en animales castrados con 2 meses. En el hipotálamo y la corteza prefrontal hubo un incremento en el nivel de fosforilación de ERK1 y ERK2 en el grupo 60/90. En el hipocampo, sólo se observó dicho incremento en ERK1. Finalmente, no hubo cambios en el nivel de activación de ninguna de las dos quinasas en cerebelo. 60/70: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 10 días; 60/90: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 30 días. * $P < 0,05$ vs 60/70 (Test de Mann-Whitney).

Al comparar los grupos 60/90 y 80/90, todos los cambios observados en los niveles de fosforilación de ERK1/2 fueron incrementos. En el hipocampo sólo se encontraron diferencias significativas en el nivel de fosforilación de ERK1, mientras que en el hipotálamo y la corteza prefrontal, los niveles de fosforilación se vieron incrementados tanto en ERK1 como en ERK2. El grado de activación de ambas proteínas permaneció constante en el cerebelo (Tabla 5).

Tabla 5. Resumen de los cambios observados debido al paso del tiempo tras la ovariectomía en los niveles de fosforilación de ERK1 y de ERK2 en animales ovariectomizados con 2 meses de edad. En cada casilla se indica el número de veces en las que se modifica el nivel de fosforilación de las quinasas en los animales con 30 días de OVX, en comparación con los animales con 10 días. Los incrementos se marcan en rojo y las disminuciones en verde. Las celdas se destacan en gris cuando las diferencias alcanzan la significación estadística ($p < 0,05$).

	P-ERK1	P-ERK2
Hipocampo	4,11	1,28
Hipotálamo	11,86	5,28
Corteza prefrontal	4,5	12,02
Cerebelo	12,24	11,8

1.1.3 Receptores de IGF-I y de estradiol

Dado que en este estudio se estaba analizando la interacción entre el IGF-I y el estrógeno, nos pareció necesario prestar atención a sus receptores. Así pues, cuantificamos el nivel de expresión de los receptores de estrógeno y del receptor de IGF-I.

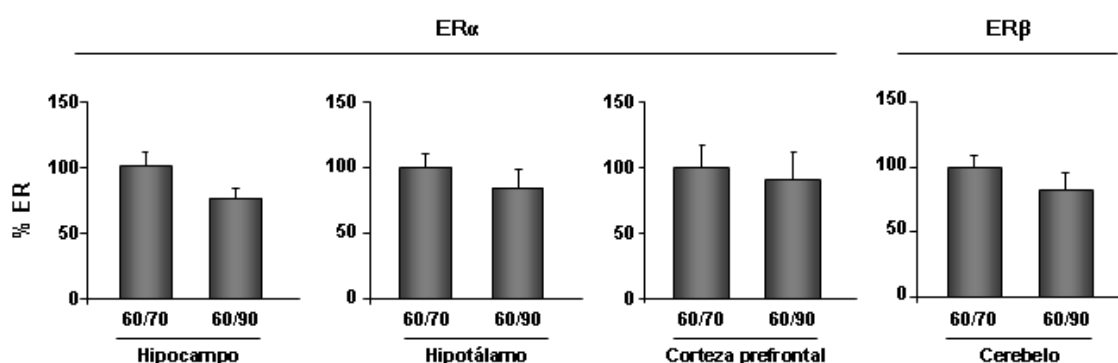


Figura 15. Efecto del tiempo sin hormonas gonadales debido a la OVX, sobre el nivel de expresión de los receptores de estrógeno en animales castrados con 2 meses. No hubo cambios en el nivel de los receptores de estrógeno en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas. 60/70: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 10 días; 60/90: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 30 días.

RESULTADOS

En el caso de los receptores de estrógeno, en cada región cerebral se estudió la isoforma que mayoritariamente se expresa. Así pues en el hipocampo, el hipotálamo y la corteza prefrontal, se analizó el nivel del $ER\alpha$ y en cerebelo el del $ER\beta$. El nivel de expresión de los receptores de estrógeno no se vio modificado, en ninguna de las cuatro regiones analizadas, al comparar los animales sacrificados a los 10 días de la operación, con los sacrificados a los 30 días (Fig 15).

En el caso del receptor de IGF-I, tampoco se observaron cambios en sus niveles de expresión en el hipocampo, el hipotálamo y la corteza prefrontal. Sin embargo en el cerebelo, resultó haber menor cantidad en el grupo 60/90 que en el grupo 60/70 (Fig 16).

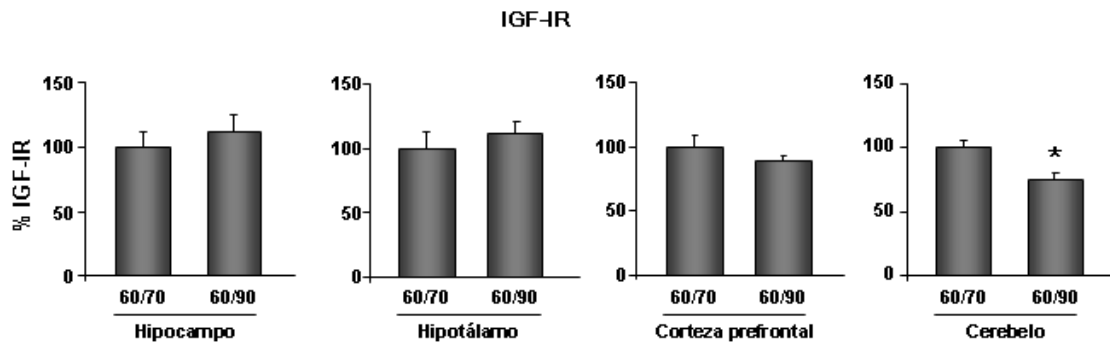


Figura 16. Efecto del tiempo sin hormonas gonadales debido a la OVX, sobre el nivel de expresión del receptor de IGF-I en animales castrados con 2 meses. No hubo cambios en el nivel del receptor de IGF-I en el hipocampo, el hipotálamo ni la corteza prefrontal. En el cerebelo, por el contrario se observó una disminución en el nivel del receptor en el grupo 60/90. 60/70: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 10 días; 60/90: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 30 días. * $P < 0,05$ vs 60/70 (Test de Mann-Whitney).

El paso del tiempo tras la ovariectomía no parece afectar al nivel de expresión de los receptores de estrógeno ni de IGF-I. Así pues, como muestra la tabla 6, no se encontraron diferencias significativas en el nivel de expresión de los receptores de estrógeno en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas. Y en el caso del receptor de IGF-I, las diferencias detectadas en el nivel de expresión del mismo, sólo alcanzaron la significancia estadística en el cerebelo.

Tabla 6. Resumen de los cambios observados debido al paso del tiempo tras la ovariectomía en los niveles de expresión de los receptores de IGF-I y de estrógeno en animales ovariectomizados con 2 meses de edad. En cada casilla se indica el número de veces en las que se modifica el nivel de expresión de los receptores en los animales con 30 días de OVX, en comparación con los animales con 10 días. Los incrementos se marcan en rojo y las disminuciones en verde. Las celdas se destacan en gris cuando las diferencias alcanzan la significación estadística ($p < 0,05$).

	ER α / β	IGF-IR
Hipocampo	1,31	1,12
Hipotálamo	1,17	1,11
Corteza prefrontal	1,1	1,13
Cerebelo	1,22	1,34

1.2 INTERACCIÓN DE LA EDAD DE OVARIECTOMÍA, CON EL PASO DEL TIEMPO TRAS LA MISMA

Los datos del experimento anterior parecen mostrar que las diferencias observadas entre los dos grupos del estudio, son consecuencia de la duración del tiempo transcurrido entre la ovariectomía y el sacrificio. Pero para poder llegar a una conclusión válida, hace falta descartar que dichas diferencias no sean debidas a la edad a la que, en cada caso, son sacrificados los animales. Para ello, como se explicó en el diseño experimental, hicimos un tercer grupo de animales, el 80/90, en el que la edad de sacrificio fue la misma que la del grupo 60/90, tres meses de edad, y en el que desde la ovariectomía hasta el sacrificio transcurrieron sólo 10 días, como en el grupo 60/70. Comparando este grupo con el que ya tenemos de 30 días de post OVX, 60/90, y contrastando los resultados obtenidos con los del experimento anterior, podremos clarificar si los cambios observados se deben únicamente al tiempo transcurrido tras la ovariectomía, o si la edad también influye en la regulación del estado basal de las vías de la PI3K y de las MAPKs.

1.2.1 Vía de la PI3K

Al igual que en el experimento anterior, al comparar entre estos dos grupos el nivel de fosforilación de Akt, no se observaron cambios, ni en el hipotálamo, ni en el cerebelo. Sin embargo, en el hipocampo y en la corteza prefrontal, el nivel de fosforilación de Akt resultó mayor en el grupo 60/90 que en el grupo 80/90 (Fig 17).

RESULTADOS

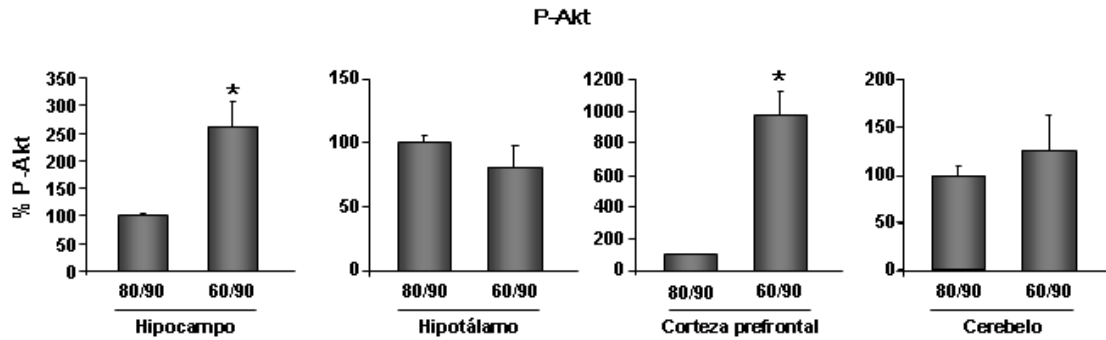


Figura 17. Efecto del tiempo sin hormonas gonadales debido a la OVX, sobre la fosforilación de Akt en animales sacrificados con 3 meses tras 10 ó 30 días después de su castración. No hubo cambios en el nivel de fosforilación de Akt ni en el hipotálamo, ni en el cerebelo. Por el contrario, en el hipocampo y la corteza prefrontal se observaron mayores niveles de fosforilación de Akt en el grupo 60/90. 80/90: animales OVX con 2 meses y 20 días y sacrificados a los 10 días; 60/90: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 30 días. * $P < 0,05$ vs 80/90 (Test de Mann-Whitney).

Nuevamente, se observaron efectos contrapuestos entre la fosforilación de Akt y la de GSK3 β . De hecho, en el hipocampo y en la corteza prefrontal, en los que acabamos de ver que sí hubo diferencias en el nivel de fosforilación de Akt, no hubo cambios significativos en el nivel de fosforilación de GSK3 β . Sin embargo, el hipotálamo mostró mayor nivel de fosforilación en GSK3 β en el grupo 60/90; mientras que en el cerebelo, se observó una disminución del nivel de fosforilación de GSK3 β en el grupo 60/90 (Fig 18).

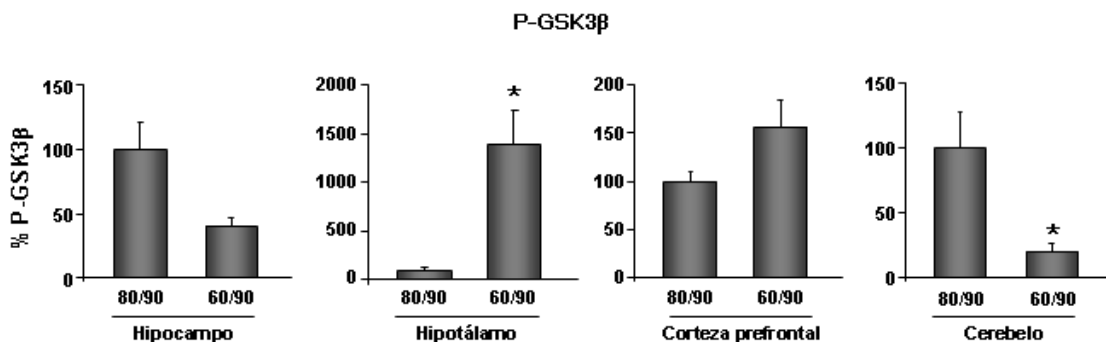


Figura 18. Efecto del tiempo sin hormonas gonadales debido a la OVX, sobre la fosforilación de GSK3 β en animales sacrificados con 3 meses tras 10 ó 30 días después de su castración. No hubo cambios en el nivel de fosforilación de GSK3 β ni en el hipocampo, ni en la corteza prefrontal. En el hipotálamo se observó un mayor grado de fosforilación de GSK3 β en el grupo 60/90. En el cerebelo, por el contrario, lo que se observó fue una disminución en el nivel de fosforilación de GSK3 β en el grupo 60/90. 80/90: animales OVX con 2 meses y 20 días y sacrificados a los 10 días; 60/90: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 30 días. * $P < 0,05$ vs 80/90 (Test de Mann-Whitney).

Como se puede ver en la tabla 7, al comparar los grupos 60/90 y 80/90 se encontraron diferencias significativas en el nivel de fosforilación de Akt, en el hipocampo y la corteza prefrontal, pero no en el nivel de fosforilación de GSK3 β . Por el contrario, el grado de activación de GSK3 β sí varió en el hipotálamo y en el cerebelo.

Tabla 7. Resumen de los cambios observados debido al paso del tiempo tras la ovariectomía en los niveles de fosforilación de Akt y de GSK3 β en animales sacrificados con 3 meses tras 10 ó 30 días después de su castración. En cada casilla se indica el número de veces en las que se modifica el nivel de fosforilación de las quinasas en los animales con 30 días de OVX, en comparación con los animales con 10 días. Los incrementos se marcan en rojo y las disminuciones en verde. Las celdas se destacan en gris cuando las diferencias alcanzan la significación estadística ($p < 0,05$).

	P-Akt	P-GSK3 β
Hipocampo	2,64	2,51
Hipotálamo	1,23	13,92
Corteza prefrontal	9,75	1,56
Cerebelo	1,25	5,13

1.2.2 Vía de las MAPKs

Coincidiendo con lo observado en el análisis del primer experimento, los niveles de fosforilación de ERK1/2 en el hipotálamo y en la corteza prefrontal, fueron mayores en los animales que llevaban 30 días de ovariectomía en el momento de su sacrificio, que en los que sólo llevaban 10 días. En el hipocampo, nuevamente, se observó un incremento en el nivel de fosforilación de ERK1 en el grupo 60/90. Sin embargo, en contraposición a los resultados del primer experimento, en este segundo, sí que se observaron diferencias en los niveles de fosforilación de ERK1/2 en el cerebelo. Así pues, se observó que el nivel de fosforilación tanto de ERK1, como de ERK2, fue menor en los animales que llevaban 30 días de ovariectomía en el momento de su sacrificio, que en los que sólo llevaban 10 días (Fig 19).

RESULTADOS

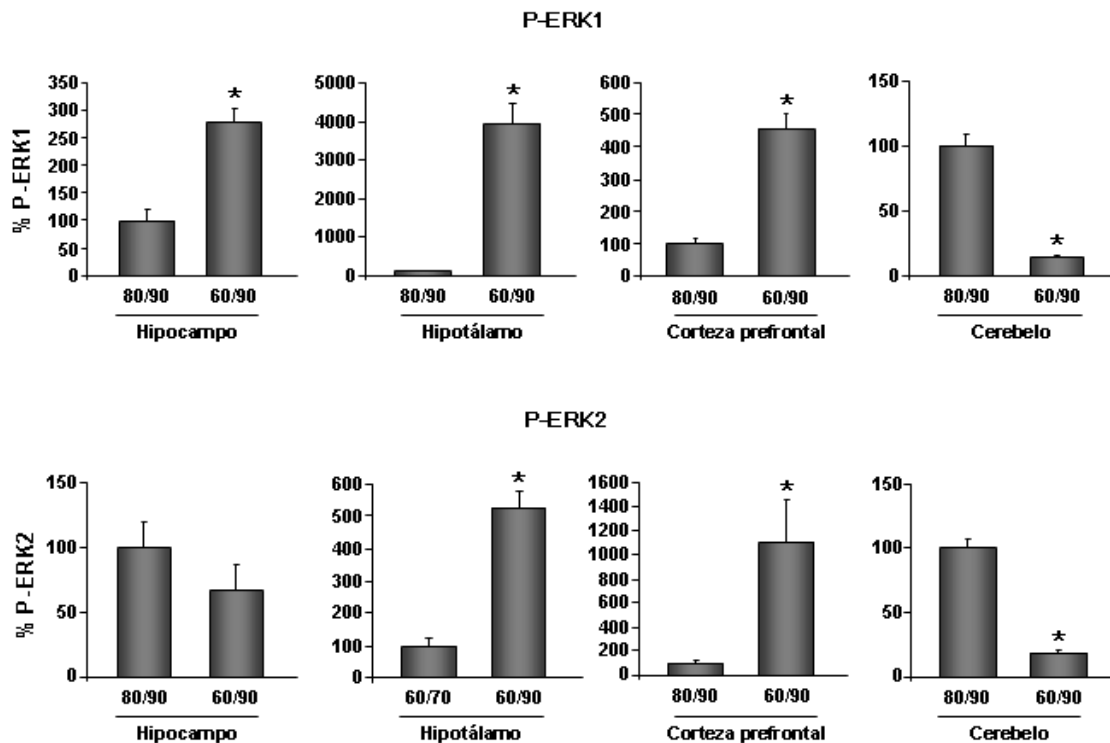


Figura 19. Efecto del tiempo sin hormonas gonadales debido a la OVX, sobre la vía de las MAPKs en animales sacrificados con 3 meses tras 10 ó 30 días después de su castración. En el hipotálamo y la corteza prefrontal hubo un incremento en los niveles de fosforilación de ERK1 y de ERK2 en el grupo 60/90 con respecto al grupo 80/90. En el hipocampo, sólo se observó dicho incremento en ERK1. Finalmente, en el cerebelo, el nivel de activación de las dos quinasas fue menor en el grupo 60/90. 80/90: animales OVX con 2 meses y 20 días y sacrificados a los 10 días; 60/90: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 30 días. * $P < 0,05$ vs 80/90 (Test de Mann-Whitney).

El paso del tiempo tras la ovariectomía, incrementó significativamente los niveles de fosforilación de ERK1 y de ERK2 en el hipotálamo y la corteza prefrontal, mientras que en el hipocampo, las diferencias significativas se limitan al nivel de fosforilación de ERK1. Por el contrario, el paso del tiempo tras la ovariectomía redujo el nivel de fosforilación de ambas quinasas en el cerebelo (Tabla 8).

Tabla 8. Resumen de los cambios observados debido al paso del tiempo tras la ovariectomía en los niveles de fosforilación de ERK1 y de ERK2 en animales sacrificados con 3 meses tras 10 ó 30 días después de su castración. En cada casilla se indica el número de veces en las que se modifica el nivel de fosforilación de las quinasas en los animales con 30 días de OVX, en comparación con los animales con 10 días. Los incrementos se marcan en rojo y las disminuciones en verde. Las celdas se destacan en gris cuando las diferencias alcanzan la significación estadística ($p < 0,05$).

	P-ERK1	P-ERK2
Hipocampo	2,79	1,49
Hipotálamo	39,55	9,24
Corteza prefrontal	4,56	11,02
Cerebelo	7,14	5,29

1.2.3 Receptores de IGF-I y de estradiol

El tiempo transcurrido tras la ovariectomía no generó cambios en el nivel de expresión de ninguno de los dos receptores, ni en el hipotálamo, ni en el cerebelo (Fig 20, 21).

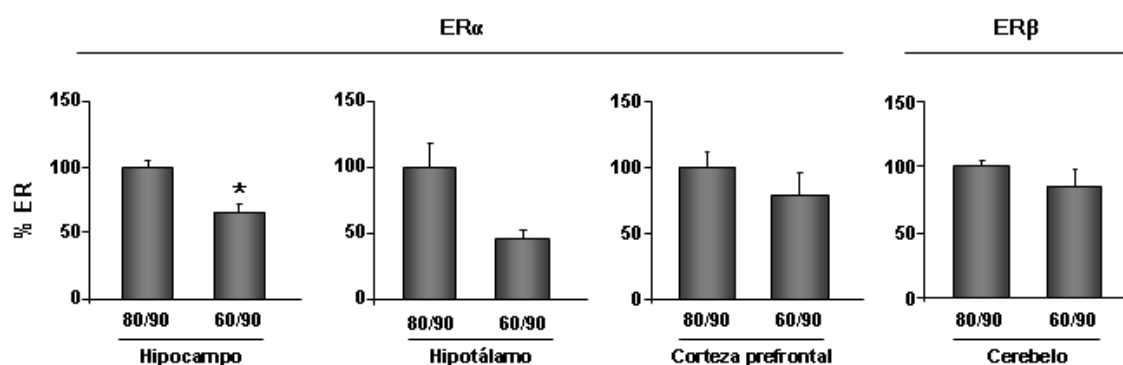


Figura 20. Efecto del tiempo sin hormonas gonadales debido a la OVX sobre el nivel de expresión de los receptores de estrógeno en animales sacrificados con 3 meses tras 10 ó 30 días después de su castración. Sólo se observó una disminución en el nivel del ERα del grupo 60/90 en el hipocampo del grupo 60/90. 80/90: animales OVX con 2 meses y 20 días y sacrificados a los 10 días; 60/90: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 30 días. * $P < 0,05$ vs 80/90 (Test de Mann-Whitney).

En el hipocampo no hubo cambios en el nivel del receptor de IGF-I (Fig 10) pero sí se observó una disminución del nivel del ERα al pasar de 10 días a 30 días tras la ovariectomía (Fig 9). En la corteza prefrontal, el nivel del receptor de IGF-I detectado en el grupo 60/90 fue menor que el del grupo 80/90 (Fig 10), mientras que el nivel del ERα permaneció sin cambios (Fig 9).

RESULTADOS

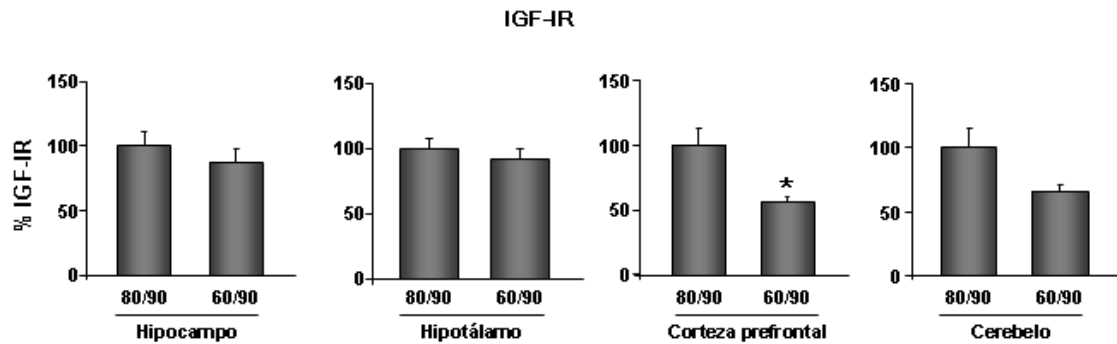


Figura 21. Efecto del tiempo sin hormonas gonadales debido a la OVX sobre el nivel de expresión del receptor de IGF-I en animales sacrificados con 3 meses tras 10 ó 30 días después de su castración. Sólo se observó una disminución en el nivel del IGF-IR en la corteza prefrontal del grupo 60/90. 80/90: animales OVX con 2 meses y 20 días y sacrificados a los 10 días; 60/90: animales OVX con 2 meses y sacrificados a los 30 días. * $P < 0,05$ vs 80/90 (Test de Mann-Whitney).

La tabla 9, muestra como al comparar los grupos 60/90 y 80/90, todos los cambios observados en los niveles de expresión de los receptores de IGF-I y de estrógeno fueron disminuciones. Pero sólo alcanzó la significancia estadística, la disminución del $ER\alpha$ en el hipocampo y la del receptor de IGF-I en la corteza prefrontal.

Tabla 9. Resumen de los cambios observados debido al paso del tiempo tras la ovariectomía en los niveles de expresión de los receptores de IGF-I y de estrógeno en animales sacrificados con 3 meses tras 10 ó 30 días después de su castración. En cada casilla se indica el número de veces en las que se modifica el nivel de expresión de los receptores en los animales con 30 días de OVX, en comparación con los animales con 10 días. Los incrementos se marcan en rojo y las disminuciones en verde. Las celdas se destacan en gris cuando las diferencias alcanzan la significación estadística ($p < 0,05$).

	$ER\alpha/\beta$	IGF-IR
Hipocampo	1,51	1,14
Hipotálamo	1,98	1,09
Corteza prefrontal	1,28	1,75
Cerebelo	1,17	1,51

2 EFECTO DE LA MADUREZ SEXUAL EN LA CAPACIDAD DEL ESTRADIOL DE ACTIVAR LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA PI3K Y DE LAS MAPKS EN CORTEZA PREFRONTAL DE RATA

En el siguiente estudio quisimos analizar si los cambios que durante la pubertad experimenta el cerebro de las ratas, llegaban a modificar su capacidad de responder a un tratamiento agudo con 17β -estradiol. Dicha respuesta fue cuantificada, como la capacidad de la hormona de interactuar con las vías de señalización de la PI3K y de las MAPKs e inducir la fosforilación de sus proteínas.

Para ello trabajamos con ratas ovariectomizadas antes de la pubertad, y que por consiguiente no habían experimentado los cambios asociados a la misma, y con ratas operadas poco después de la pubertad, de tal manera que su cerebro hubiera podido experimentar los cambios asociados a dicha etapa de maduración. En este estudio nos centramos en la corteza prefrontal, región que durante la pubertad experimenta importantes cambios que implican apoptosis, crecimiento axonal y sinaptogénesis además de modificaciones en el volumen de la sustancia gris y la sustancia blanca (Sisk y Zehr, 2005).

Nuevamente, en un intento de facilitar la comprensión de los resultados obtenidos, se muestran por separado los análisis de cada una de las dos vías estudiadas: la de la PI3K y la de las MAPKs.

2.1 VÍA DE LA PI3K

En el primer grupo experimental, las ratas fueron ovariectomizadas a los 50 días de vida postnatal (tras la pubertad) y tratadas con estradiol o su vehículo a los 10 días de la operación. Los animales fueron sacrificados 24 horas después del tratamiento (P61). En este grupo 50/61, tanto el nivel de fosforilación de Akt como el de GSK3 β se vio incrementado significativamente en respuesta al tratamiento con estradiol (Fig 22 A y B).

RESULTADOS

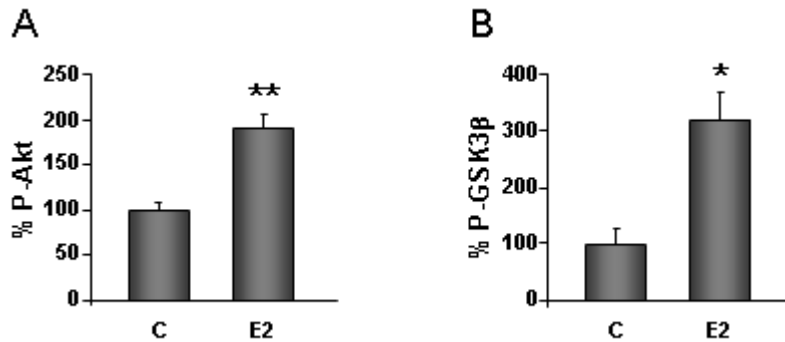


Figura 22. Efecto del estradiol sobre la vía de la PI3K en la corteza prefrontal de los animales del grupo 50/61. A) El nivel de fosforilación de Akt aumentó en respuesta al tratamiento hormonal. **B)** El nivel de fosforilación de GSK3β se vio incrementado tras el tratamiento con estradiol. C: animales tratados con vehículo; E2: animales tratados con 17β-estradiol. * $P < 0,05$ vs control; ** $P < 0,01$ vs control (Test de Mann-Whitney).

En el segundo grupo, las ratas fueron ovariectomizadas al mes de vida postnatal (P30), antes de alcanzar la pubertad. Posteriormente, a los dos meses de edad, la misma a la que recibieron el tratamiento los animales del primer grupo, las ratas fueron tratadas con estradiol o su vehículo. Finalmente, 24 horas después del tratamiento (P61) fueron sacrificadas mediante decapitación (grupo 30/61).

En estos animales, al contrario de lo observado en el grupo 50/61, el estradiol no generó modificaciones significativas en el nivel de fosforilación de Akt, ni en el de GSK3β, que pudiera ser detectado a las 24h de su administración (Fig 23 A y B).

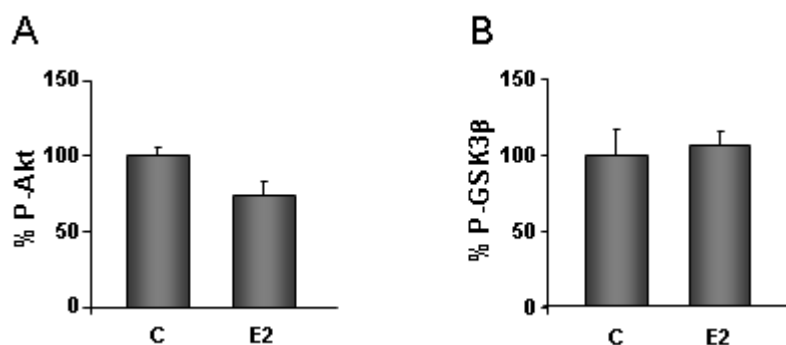


Figura 23. Efecto del estradiol sobre la vía de la PI3K en la corteza prefrontal de los animales del grupo 30/61. A) El nivel de fosforilación de Akt no presentó diferencias entre los animales tratados con vehículo y los tratados con estradiol. **B)** El nivel de fosforilación de GSK3β no cambió a pesar del tratamiento con estradiol. C: animales tratados con vehículo; E2: animales tratados con 17β-estradiol.

Finalmente, hicimos un tercer grupo para descartar que las diferencias observadas hasta ahora se debieran a que en los dos grupos analizados, el tiempo transcurrido entre la ovariectomía y el tratamiento era diferente.

En este tercer grupo, las ratas fueron ovariectomizadas al mes de edad, nuevamente antes de alcanzar la pubertad y tratadas con estradiol o su vehículo a los 10 días de la operación, el mismo tiempo de post ovariectomía que presentó el primer grupo. Al igual que en los otros dos experimentos, los animales fueron sacrificados 24h después del tratamiento (P41) (grupo 30/41). En estos animales, los niveles de fosforilación de Akt y de GSK3 β tampoco mostraron diferencias significativas entre los animales control y los tratados con la hormona (Fig 24).

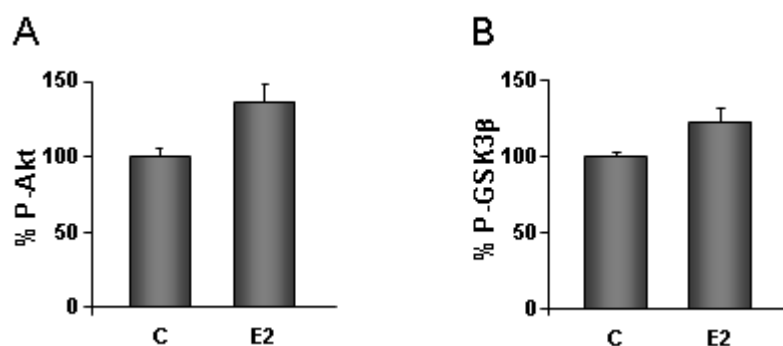


Figura 24. Efecto del estradiol sobre la vía de la PI3K en la corteza prefrontal de los animales del grupo 30/41. A) El nivel de fosforilación de Akt fue igual en los animales tratados con vehículo y en los tratados con estradiol. **B)** El nivel de fosforilación de GSK3 β tampoco mostró cambios a pesar del tratamiento con estradiol. C: animales tratados con vehículo; E2: animales tratados con 17 β -estradiol.

Para determinar si la edad a la que los animales eran ovariectomizados o a la que eran sacrificados, afectaba a los niveles basales de expresión de Akt y de GSK3 β , se llevó a cabo una última comparación. Para ello, en un mismo gel se analizaron muestras de los animales control de los tres grupos experimentales. Como no se detectaron cambios significativos, podemos concluir que los niveles basales de ambas proteínas permanecen constantes (Fig 25).

RESULTADOS

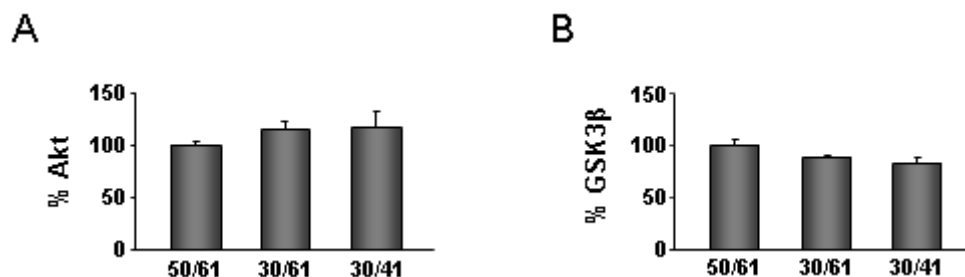


Figura 25. Niveles basales de expresión de Akt y de GSK3β en la corteza prefrontal de los animales tratados con vehículo en los tres grupos experimentales. A) El nivel de expresión de Akt no mostró cambios al comparar las condiciones basales de los tres grupos. **B)** El nivel basal de expresión de GSK3β fue igual en los tres grupos. Los datos están normalizados al valor del grupo 50/61. 50/61: animales OVX con 1 mes y 20 días y sacrificados a los 11 días; 30/61: animales OVX con 1 mes y sacrificados a los 31 días; 30/41: animales OVX con 1 mes y sacrificados a los 11 días.

2.2 RECEPTORES DE IGF-I Y DE ESTRADIOL

Al estudiar la interacción entre los mecanismos de acción del IGF-I y el estrógeno, nos pareció necesario prestar especial atención al nivel de expresión y a la localización de sus receptores a fin de buscar algún cambio entre los animales ovariectomizados antes y los ovariectomizados después de la pubertad, que explicara los resultados obtenidos.

Por ello, en primer lugar analizamos, en los tres grupos experimentales, si el tratamiento hormonal generaba cambios en los niveles de expresión de los receptores de ambas moléculas. Pero en ninguno de los tres grupos, se observaron cambios significativos como respuesta al tratamiento en los niveles de los receptores de IGF-I o de estrógeno (Fig 26).

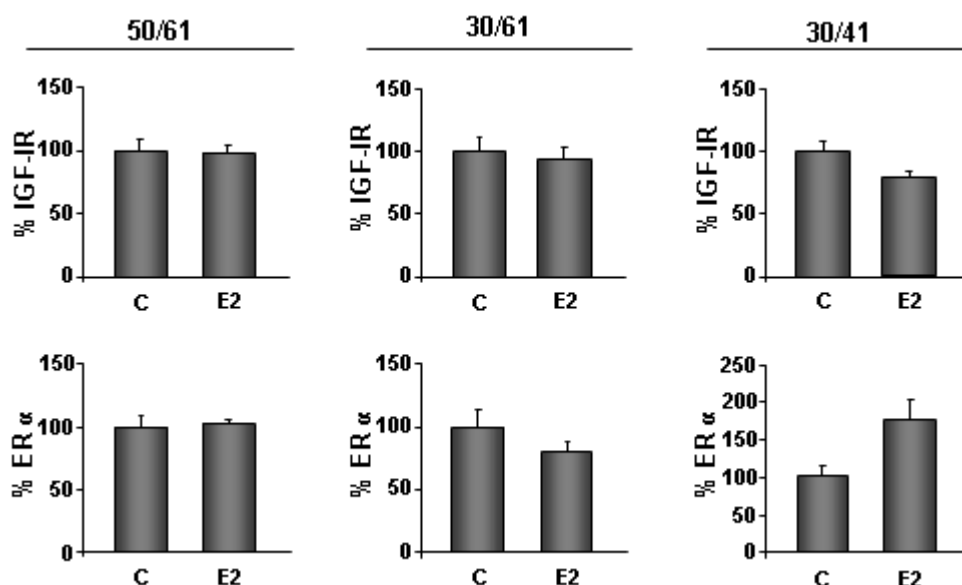


Figura 26. Efecto del estradiol sobre los niveles de expresión de IGF-IR y de ERα en la corteza prefrontal de los tres grupos experimentales. Los niveles de expresión de ambos receptores no presentaron diferencias significativas entre los animales tratados con estradiol y los tratados con su vehículo en ninguno de los tres grupos experimentales. C: animales tratados con vehículo; E2: animales tratados con 17β-estradiol. 50/61: animales OVX con 1 mes y 20 días y sacrificados a los 11 días; 30/61: animales OVX con 1 mes y sacrificados a los 31 días; 30/41: animales OVX con 1 mes y sacrificados a los 11 días.

Después, igual que hicimos con las proteínas de la vía de la PI3K, pasamos a estudiar si la edad a la que los animales eran ovariectomizados o a la que eran sacrificados afectaba a los niveles basales de expresión de los receptores. Sin embargo, los datos obtenidos al comparar los niveles de expresión de ERα o IGF-IR entre los animales tratados con vehículo, no mostraron diferencias significativas, en ninguno de los tres grupos experimentales (Fig 27).

RESULTADOS

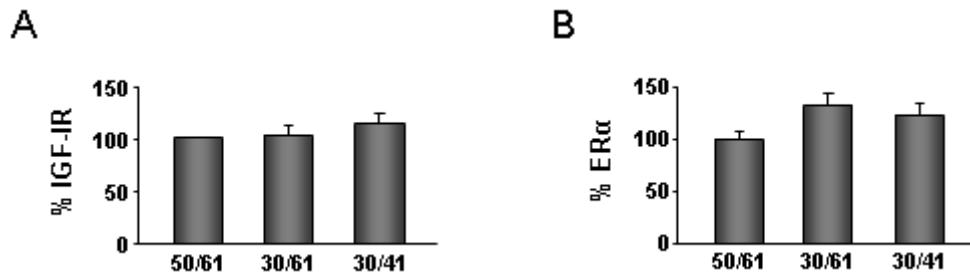


Figura 27. Niveles basales de expresión de IGF-IR y de ERα en la corteza prefrontal de los animales tratados con vehículo en los tres grupos experimentales. Los niveles basales de expresión de ambos receptores no mostraron cambios al comparar los animales control de los tres grupos experimentales. Los datos están normalizados al valor del grupo 50/61. 50/61: animales OVX con 1 mes y 20 días y sacrificados a los 11 días; 30/61: animales OVX con 1 mes y sacrificados a los 31 días; 30/41: animales OVX con 1 mes y sacrificados a los 11 días.

Finalmente, se estudiaron mediante inmunohistoquímica, las posibles modificaciones en la localización tisular o subcelular, de los dos receptores en los controles de los animales ovariectomizados, antes y después de la pubertad.

En el caso del ERα, el marcaje se localiza en lo que parece ser el núcleo celular de neuronas, tanto en los animales prepuberales como en los postpuberales. Dicho marcaje, que fue de baja intensidad en la mayoría de las células, resultó ser particularmente abundante en las capas II/III y en la IV (Fig 28).

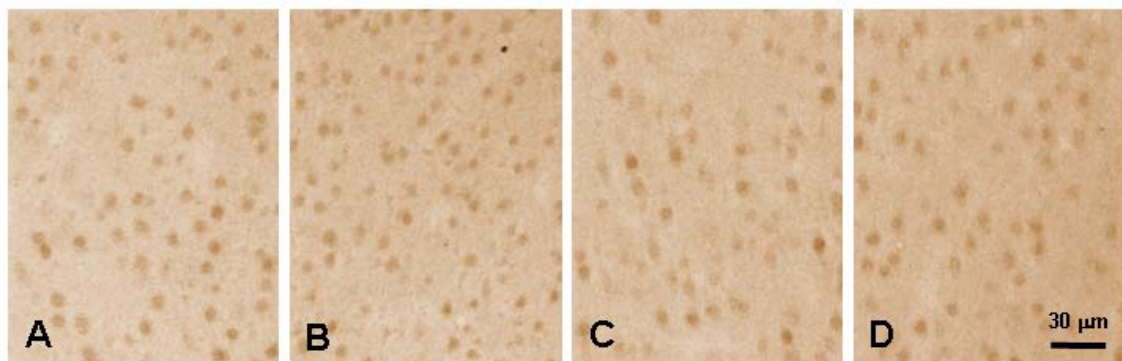


Figura 28. Localización subcelular de ERα en las capas II/III de la corteza prefrontal de animales prepuberales y postpuberales. Las imágenes muestran cómo el marcaje se localizó en el núcleo de las neuronas de la corteza prefrontal en los dos grupos experimentales. **A)** Área prelímbica de una rata prepuberal. **B)** Área prelímbica de una rata postpuberal. **C)** Subdivisión dorsal de la corteza cingular anterior de una rata prepuberal. **D)** Subdivisión dorsal de la corteza cingular anterior de una rata postpuberal. Todas las imágenes tienen el mismo aumento.

Además, empleando el método del disector óptico, se realizó un análisis cuantitativo del número de núcleos celulares inmunorreactivos para $ER\alpha$, tanto en la subdivisión dorsal de la corteza cingular, como en el área prelímbica y no se observaron diferencias significativas entre los animales ovariectomizados antes de la pubertad y los ovariectomizados después (Fig 29).

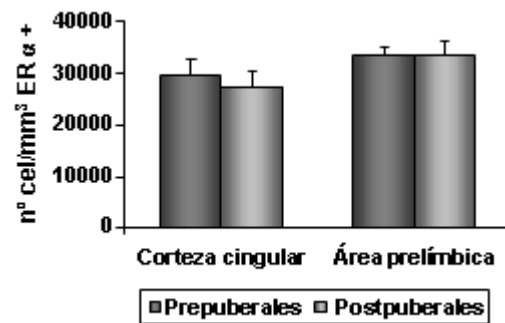


Figura 29. Recuento de las neuronas $ER\alpha$ positivas en las capas II/III de la corteza prefrontal de animales prepuberales y postpuberales. No se observaron diferencias en el número de células inmunorreactivas para $ER\alpha$ en ninguna de las dos regiones estudiadas, el área prelímbica y la subdivisión dorsal de la corteza cingular anterior, entre los animales ovariectomizados antes de la pubertad y los ovariectomizados después. Prepuberales: animales OVX con 1 mes y sacrificados a los 11 días; Postpuberales: animales OVX con 1 mes y 20 días y sacrificados a los 11 días.

En cuanto al receptor de IGF-I, su marcaje fue detectado en el cuerpo celular y en la dendrita apical de las neuronas piramidales y no se observaron claras diferencias en cuanto al patrón de distribución subcelular entre los animales pre y postpuberales (Fig 30). Igual que se observó para $ER\alpha$, las neuronas inmunorreactivas para el receptor de IGF-I fueron más abundantes en las capas II/III y IV de la corteza (Fig 30).

RESULTADOS

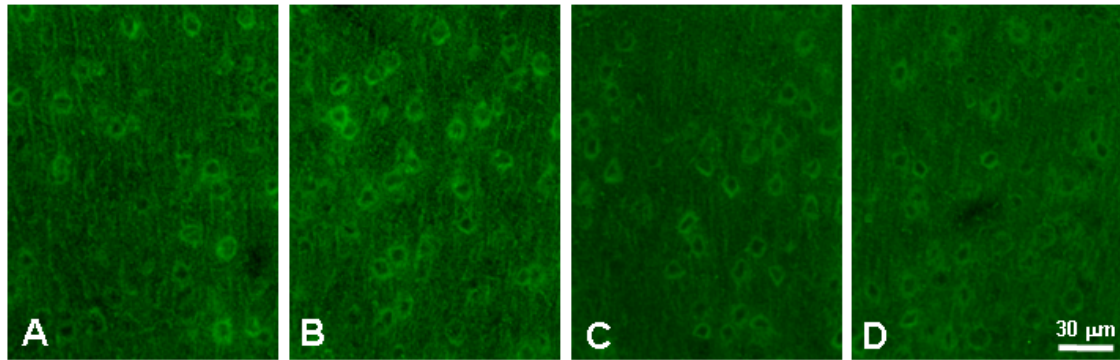


Figura 30. Localización subcelular del receptor de IGF-I en la capa IV de la corteza prefrontal de animales prepuberales y postpuberales. Las imágenes muestran como el marcaje se localizó en el cuerpo celular y en la dendrita apical de las neuronas piramidales. **A)** Área prelímbica de una rata prepuberal. **B)** Área prelímbica de una rata postpuberal. **C)** Subdivisión dorsal de la corteza cingular anterior de una rata prepuberal. **D)** Subdivisión dorsal de la corteza cingular anterior de una rata postpuberal. Todas las imágenes tienen el mismo aumento.

Así mismo, el análisis del número de células inmunorreactivas para el receptor de IGF-I, no reveló diferencias significativas entre los animales prepuberales y los postpuberales, ni en la subdivisión dorsal de la corteza cingular, ni en el área prelímbica (Fig 31).

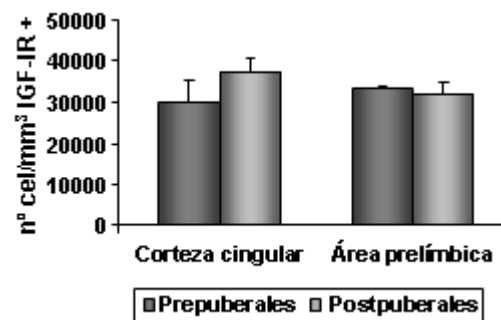


Figura 31. Recuento de las neuronas positivas para el receptor de IGF-I en las capas II/III de la corteza prefrontal de animales prepuberales y postpuberales. No se observaron diferencias en el número de células IGF-IR positivas entre los animales ovariectomizados antes de la pubertad y los ovariectomizados después, en ninguna de las dos regiones estudiadas, el área prelímbica y la subdivisión dorsal de la corteza cingular anterior. Prepuberales: animales OVX con 1 mes y sacrificados a los 11 días; Postpuberales: animales OVX con 1 mes y 20 días y sacrificados a los 11 días.

3 EFECTO DE LA EDAD, LA OVARIECTOMÍA Y EL TRATAMIENTO CON ESTRADIOL EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE IGF-I Y DE ESTRÓGENO EN CEREBRO DE RATA

Siguiendo en la línea de investigación llevada hasta ahora y centrándonos en la expresión de los receptores de estrógeno y de IGF-I, nos planteamos ampliar la información obtenida y ver cómo se veían afectados dichos receptores por una larga (16 meses) privación de hormonas gonadales. Para ello, trabajamos con ratas de 18 meses de edad, ovariectomizadas con 2 meses (16 meses de OVX), y comparamos los resultados con los obtenidos en ratas ovariectomizadas con 17 meses (1 mes de OVX).

Así mismo, teniendo en cuenta la capacidad del estradiol de regular los niveles de expresión de sus receptores y del receptor de IGF-I, estudiamos si en estas ratas viejas, y tras la ausencia de estradiol de origen gonadal, el estradiol administrado exógenamente seguía teniendo efecto. Para ello, los animales de los dos grupos anteriormente comentados, fueron tratados con 17β -estradiol o su vehículo, 6h antes del sacrificio.

Finalmente, teniendo en cuenta que los datos existentes sobre cómo la edad modifica la expresión de los receptores de estrógeno y de IGF-I en el cerebro son contradictorios, nos planteamos analizar si se observaban cambios de expresión en dichos receptores entre animales jóvenes (de 3 meses de edad) y animales viejos (de 18 meses de edad).

3.1 EFECTO DEL TIEMPO DE OVARIECTOMÍA

Para estudiar si los niveles de expresión de los receptores de IGF-I y de estrógeno se veían afectados por la duración de la privación hormonal, comparamos el grupo control de las ratas de 18 meses de edad que llevaban 16 meses ovariectomizadas, con el grupo control de las que llevaban sólo 1 mes.

Los resultados mostraron una ausencia de efecto de la duración de la privación de hormonas de origen gonadal, como consecuencia de la ovariectomía, en el nivel de expresión de $ER\beta$ en las cuatro regiones cerebrales estudiadas y en los de $ER\alpha$ en el hipocampo, el hipotálamo y la corteza prefrontal. En el cerebelo, se observó una mayor expresión de $ER\alpha$ en los animales que tienen un mes de ovariectomía, que en los que tienen 16 meses (Fig 32).

RESULTADOS

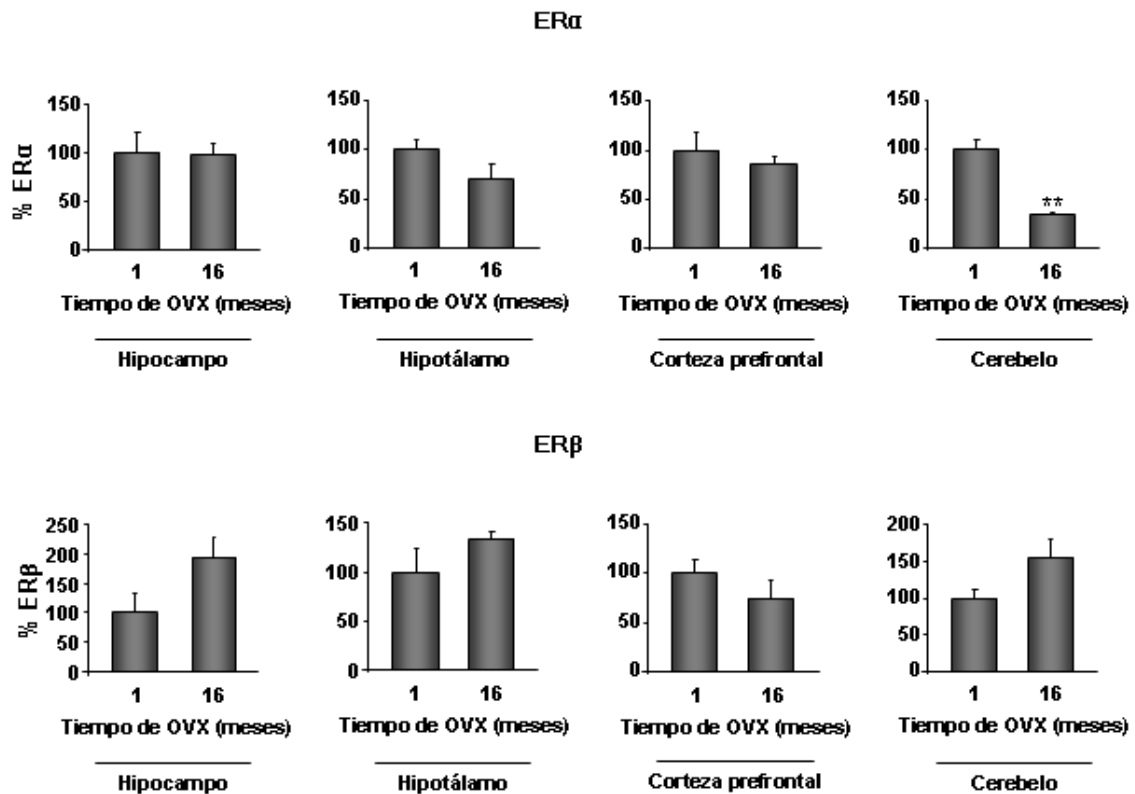


Figura 32. Efecto de la ausencia de hormonas gonadales debido a la OVX, sobre los niveles de expresión de los ER en el hipocampo, el hipotálamo, la corteza prefrontal y el cerebelo de ratas viejas. No se observaron diferencias en los niveles de expresión de ER α ni de ER β en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas, con la excepción del ER α en el cerebelo, cuya expresión fue mayor en los animales de ovariectomía corta. 1: animales que tienen 1 mes de ovariectomía; 16: animales que tienen 16 meses de ovariectomía. ** $P < 0,01$ vs 1 (Test de Mann-Whitney).

Por su parte, el receptor de IGF-I mostró ser mucho más sensible a la ausencia de hormona de origen gonadal. Así pues, el nivel de expresión del mismo se vio disminuido en el hipocampo, el hipotálamo y la corteza prefrontal como consecuencia de una ovariectomía prolongada (Fig 33).

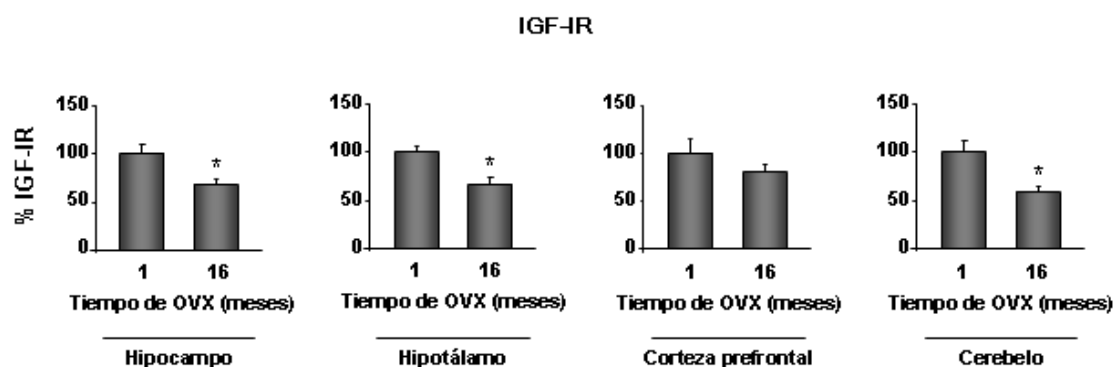


Figura 33. Efecto de la ausencia de hormonas gonadales debido a la OVX, sobre el nivel de expresión del IGF-IR en el hipocampo, el hipotálamo, la corteza prefrontal y el cerebelo de ratas viejas. La privación de hormona de origen gonadal durante 16 meses, indujo una disminución en el nivel de expresión del receptor de IGF-I en el hipocampo, el hipotálamo y el cerebelo. 1: animales que tienen 1 mes de ovariectomía; 16: animales que tienen 16 meses de ovariectomía. * $P < 0,05$ vs 1 (Test de Mann-Whitney).

3.2 EFECTO DEL TRATAMIENTO CON ESTRADIOL

Una vez estudiado el efecto de la duración de la privación hormonal, pasamos a ver si en esas dos situaciones, el tratamiento agudo con 17β -estradiol era capaz de inducir cambios en el nivel de expresión de alguno de los receptores.

Así pues, se cuantificaron los niveles de expresión de los receptores de IGF-I y de estrógeno en el cerebro de ratas de 18 meses de edad, ovariectomizadas a los 2 o a los 17 meses, y a las que se les inyectó 17β -estradiol seis horas antes del sacrificio.

Curiosamente, los resultados mostraron que el estradiol sólo fue capaz de inducir cambios en los animales con una larga ovariectomía, mientras que aquellos animales que sólo hacía un mes que perdieron el aporte de hormona gonadal, no respondieron al tratamiento (Fig 34-35).

RESULTADOS

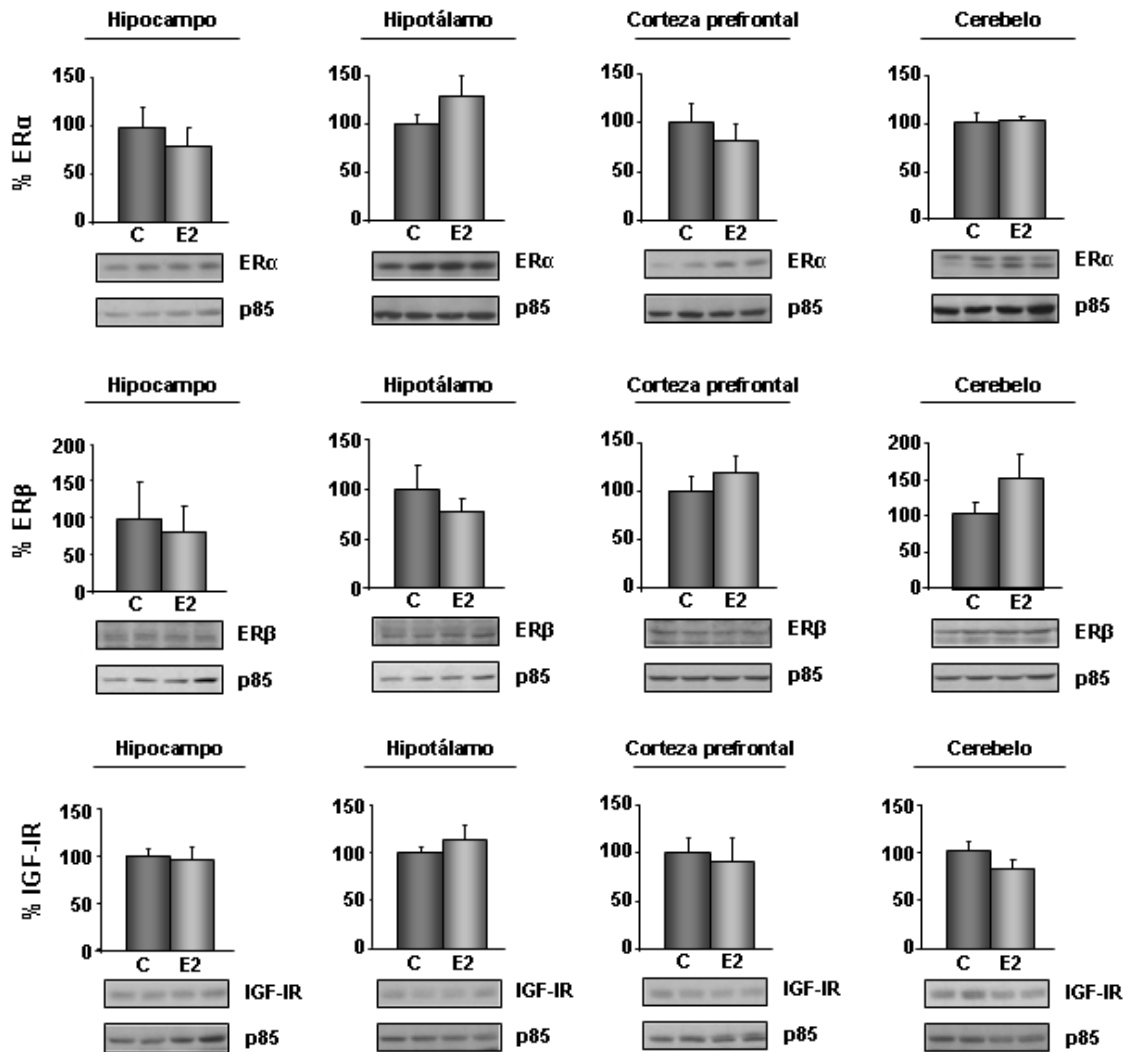


Figura 34. Efecto del tratamiento agudo con 17 β -estradiol sobre los niveles de expresión de los ERs y el IGF-IR en el cerebro de ratas que llevan 1 mes de ovariectomía. En respuesta al tratamiento con estradiol, no se observó ningún cambio en los niveles de expresión de los receptores de estrógeno o de IGF-I en ninguna de las cuatro regiones cerebrales estudiadas. C: animales tratados con vehículo; E2: animales tratados con 17 β -estradiol.

Los cambios observados en respuesta al tratamiento con estradiol se limitaron al nivel de expresión del ER β (Fig 35). Así pues, en los animales que llevaban 16 meses ovariectomizados, el tratamiento con estradiol indujo un aumento en el nivel de expresión de ER β en el hipocampo, y una disminución de la expresión del mismo receptor en el hipotálamo y en el cerebelo. Por otra parte, no se observó ninguna modificación significativa en el nivel de expresión de ER α , ni de IGF-IR en ninguna de las cuatro regiones cerebrales estudiadas (Fig 35).

RESULTADOS

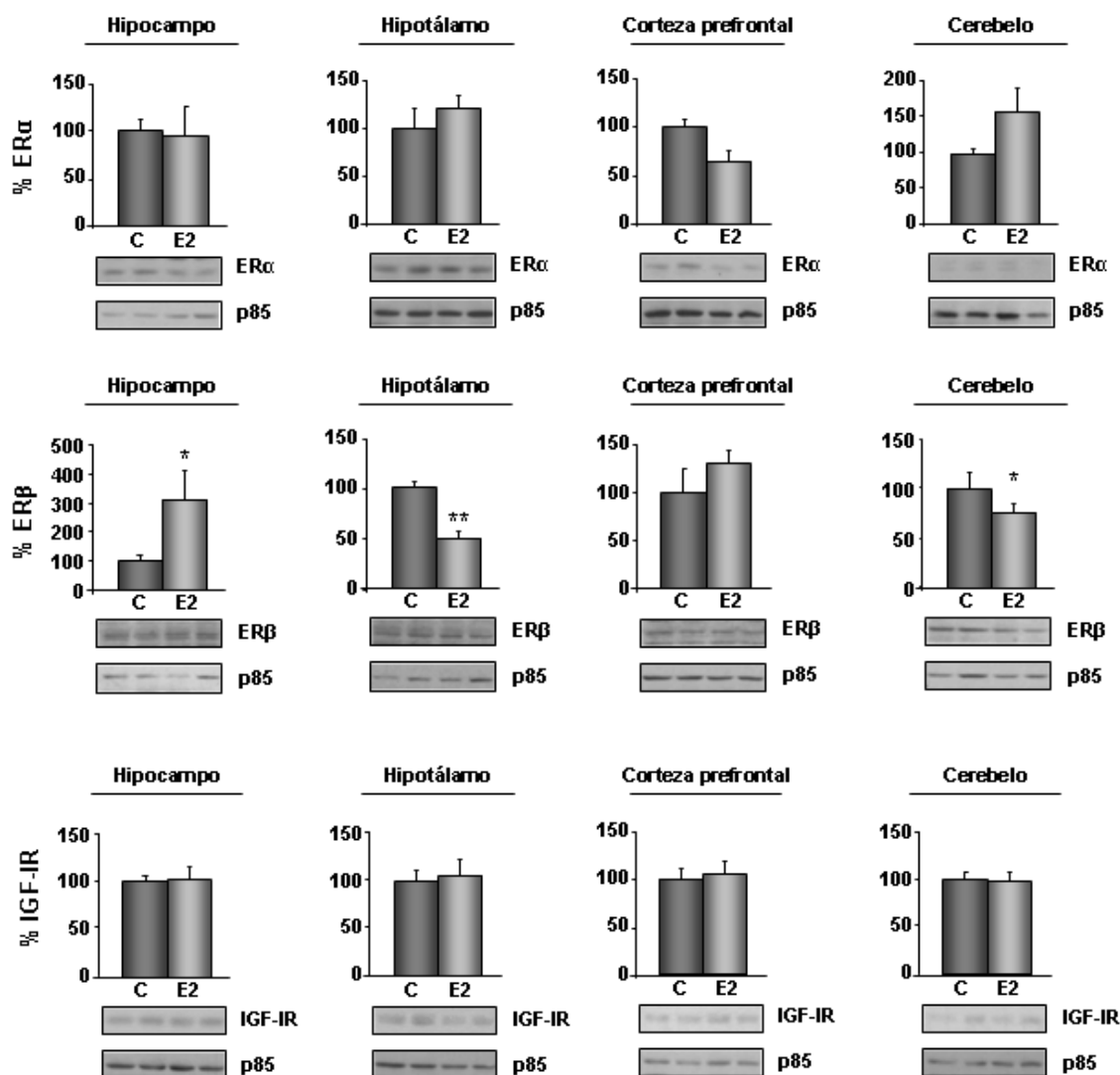


Figura 35. Efecto del tratamiento agudo con 17β -estradiol sobre los niveles de expresión de los ERs y el IGF-IR en el cerebro de ratas que llevan 16 meses de ovariectomía. En respuesta al tratamiento con estradiol, no hubo cambios en los niveles de expresión de los receptores de estrógeno o de IGF-I, salvo un incremento en el nivel de expresión de ER β en el hipocampo y una disminución de la expresión de dicho receptor en el hipotálamo y en el cerebelo. C: animales tratados con vehículo; E2: animales tratados con 17β -estradiol. * $P < 0,05$ vs control; ** $P < 0,01$ vs control (Test de Mann-Whitney).

3.3 EFECTO DE LA EDAD

Finalmente, analizamos cómo la edad afectaba a la expresión de los receptores, comparando los niveles de expresión de los receptores de IGF-I y de estrógeno en el cerebro de ratas de 3 meses y de 18 meses de edad, ovariectomizadas, en ambos casos, un mes antes del sacrificio.

RESULTADOS

El análisis de expresión de proteínas nos permitió comprobar la existencia de cambios en los receptores IGF-IR y ER β , mientras que el nivel de ER α no se vio afectado.

Los cambios en ER β se limitaron al hipotálamo, dónde el nivel de expresión del receptor resultó ser menor en las ratas viejas. En el resto de las regiones cerebrales no se observó ninguna variación significativa en el nivel de expresión, ni de ER β ni de ER α (Fig 36).

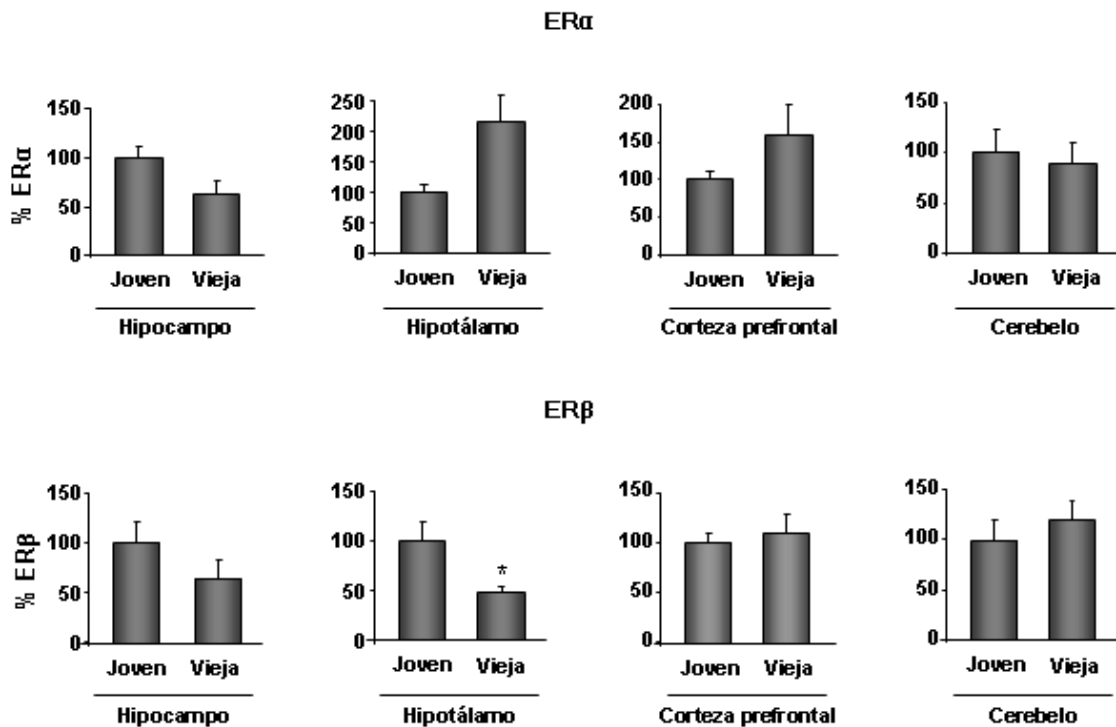


Figura 36. Efecto del envejecimiento sobre los niveles de expresión de los receptores de estrógeno en el cerebro de rata. El envejecimiento no produjo ningún cambio en el nivel de expresión de ninguna de las dos isoformas de ER con la excepción de una disminución de ER β en el hipotálamo. Joven: animales de 3 meses ovariectomizados con 2 meses; Vieja: animales de 18 meses ovariectomizados con 17 meses. * $P < 0,05$ vs Joven (Test de Mann-Whitney).

Por otra parte se observó, asociado al envejecimiento, un incremento en el nivel de expresión del receptor de IGF-I en el hipocampo y en el hipotálamo. En el cerebelo, el envejecimiento tuvo el efecto contrario y el nivel de expresión del receptor de IGF-I se vio disminuido (Fig 37).

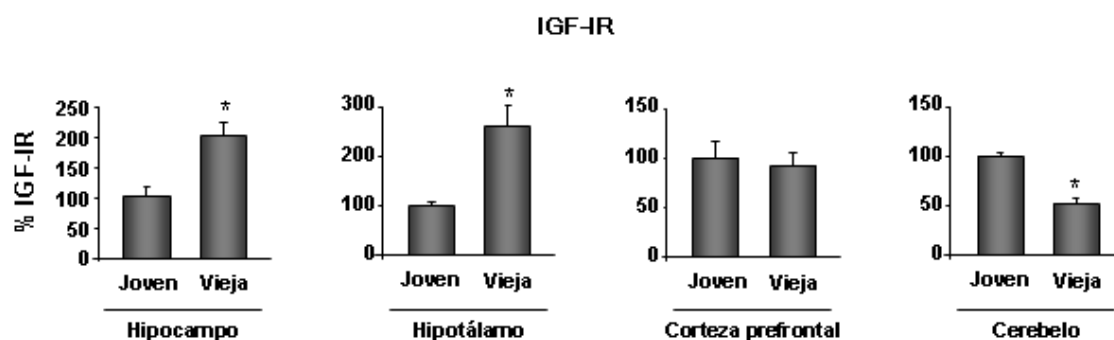


Figura 37. Efecto del envejecimiento sobre el nivel de expresión del receptor de IGF-I en el cerebro de rata. El envejecimiento produjo un incremento en el nivel de expresión del receptor de IGF-I en el hipocampo y el hipotálamo y una disminución en el cerebelo. Joven: animales de 3 meses ovariectomizados con 2 meses; Vieja: animales de 18 meses ovariectomizados con 17 meses. * $P < 0,05$ vs Joven (Test de Mann-Whitney).

4. EFECTO DE LA ACTIVIDAD AROMATASA Y DEL ESTRADIOL EXÓGENO SOBRE LAS VÍAS DE LA PI3K Y DE LAS MAPKS EN ASTROCITOS O NEURONAS

En los experimentos llevados a cabo *in vivo*, hemos querido estudiar el efecto de la ausencia de estradiol de origen gonadal en las vías de la PI3K y de las MAPKs. Además, hemos valorado la capacidad de respuesta del cerebro cuando vuelve a recibir la hormona, en este caso exógena. Sin embargo, en este modelo se nos presentó la dificultad de no poder atribuir los efectos a poblaciones celulares precisas, particularmente a neuronas o astrocitos. Con ese fin nos hemos valido de los cultivos primarios, en los que hemos valorado la respuesta celular frente al estradiol exógeno o al sintetizado localmente por la enzima aromatasa (estradiol sintetasa). Esta enzima, presente en las células nerviosas, aromatiza a la testosterona convirtiéndola en estradiol. Para ello, trabajamos con cultivos de astrocitos o neuronas de hipocampo y de corteza de rata, obtenidos como se indica en “Materiales y Métodos”, en los que realizamos tres tratamientos diferentes. Así pues, para estudiar el efecto del estradiol exógeno, tratamos a las células con 100nM de 17 β -estradiol a tiempos cortos, 20 minutos, y largos, 28 horas. Para ver el efecto de la aromatasa, empleamos letrozol, un inhibidor selectivo de la enzima. De esta manera, sometiendo a las células al inhibidor durante 28 horas, pudimos ver si el bloqueo de la enzima, con la consiguiente pérdida de estradiol endógeno, inducía algún cambio en el estado de activación de las vías de la PI3K y de las MAPKs. Finalmente, bloqueamos los receptores de estrógeno

RESULTADOS

con su antagonista ICI182780, para clarificar la importancia del receptor en los efectos observados. Se realizó una inhibición corta, mediante un pretratamiento de ICI182780 durante 30 minutos antes de la administración corta de estradiol exógeno y una larga durante 28 horas.

Antes de comenzar los experimentos, mediante inmunocitoquímica comprobamos que las células de nuestros cultivos presentaban las dos isoformas del receptor de estrógeno, el receptor de IGF-I así como la aromatasa.

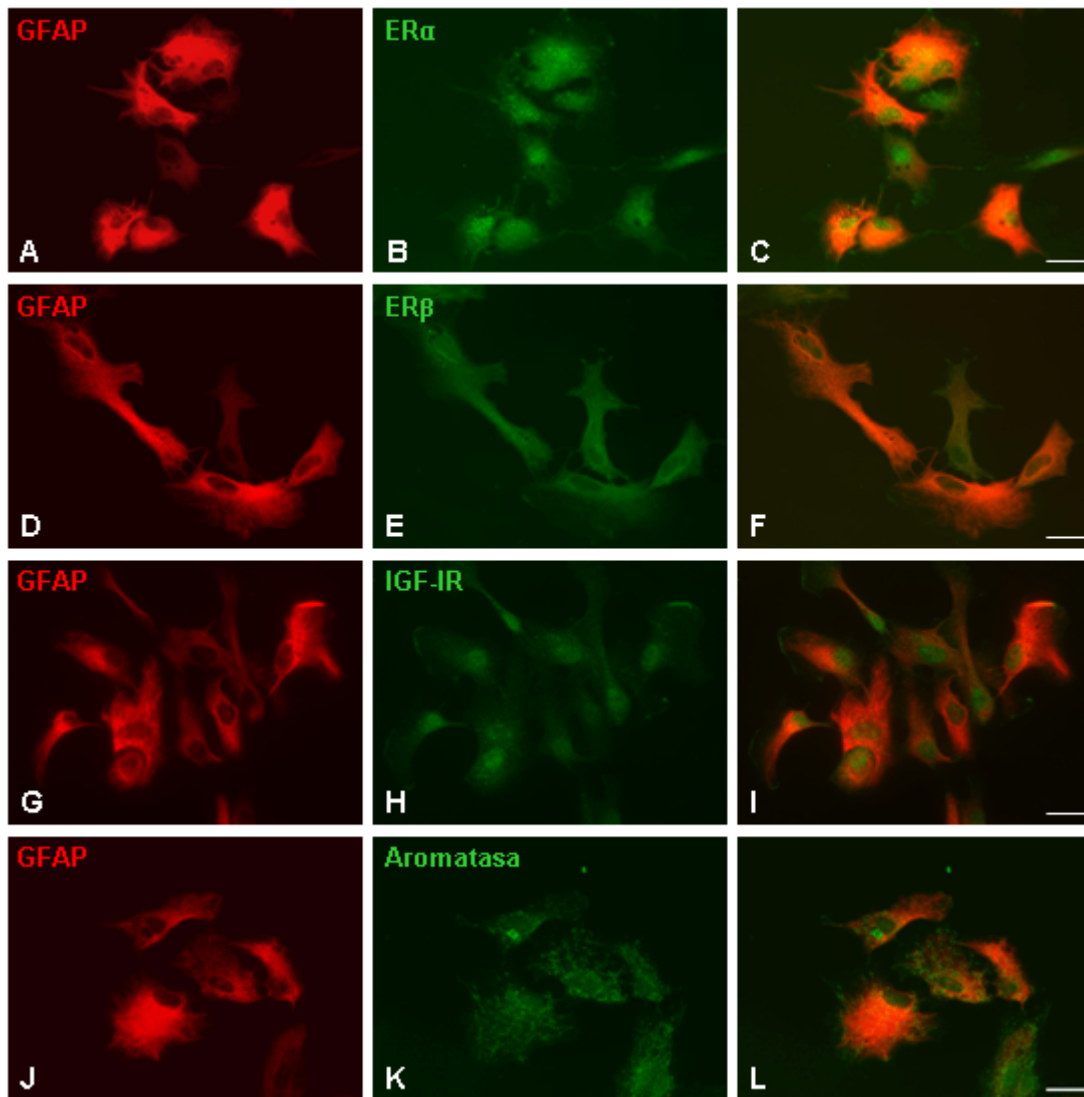


Figura 38. Expresión de la aromatasa, del receptor de IGF-I y de las dos isoformas del receptor de estrógeno, en astrocitos de corteza tratados con vehículo. **A-C)** Expresión de ER α . GFAP se marcó en rojo y ER α en verde. **D-F)** Expresión de ER β . GFAP se marcó en rojo y ER β en verde. **G-I)** Expresión de IGF-IR. GFAP se marcó en rojo e IGF-IR en verde. **J-L)** Expresión de aromatasa. GFAP se marcó en rojo y aromatasa en verde. La barra de escala corresponde a 25 μ m.

En el caso del $ER\alpha$, el marcaje se localiza en fundamentalmente en el núcleo celular aunque también se detectó expresión en el citoplasma tanto en los astrocitos como en las neuronas (Fig 38A y 39A).

El marcaje del $ER\beta$, en los astrocitos fue detectado exclusivamente en el cuerpo celular, mientras que en las neuronas además de en citoplasma, se detectó expresión del receptor en el núcleo (Fig 38 B y 39B).

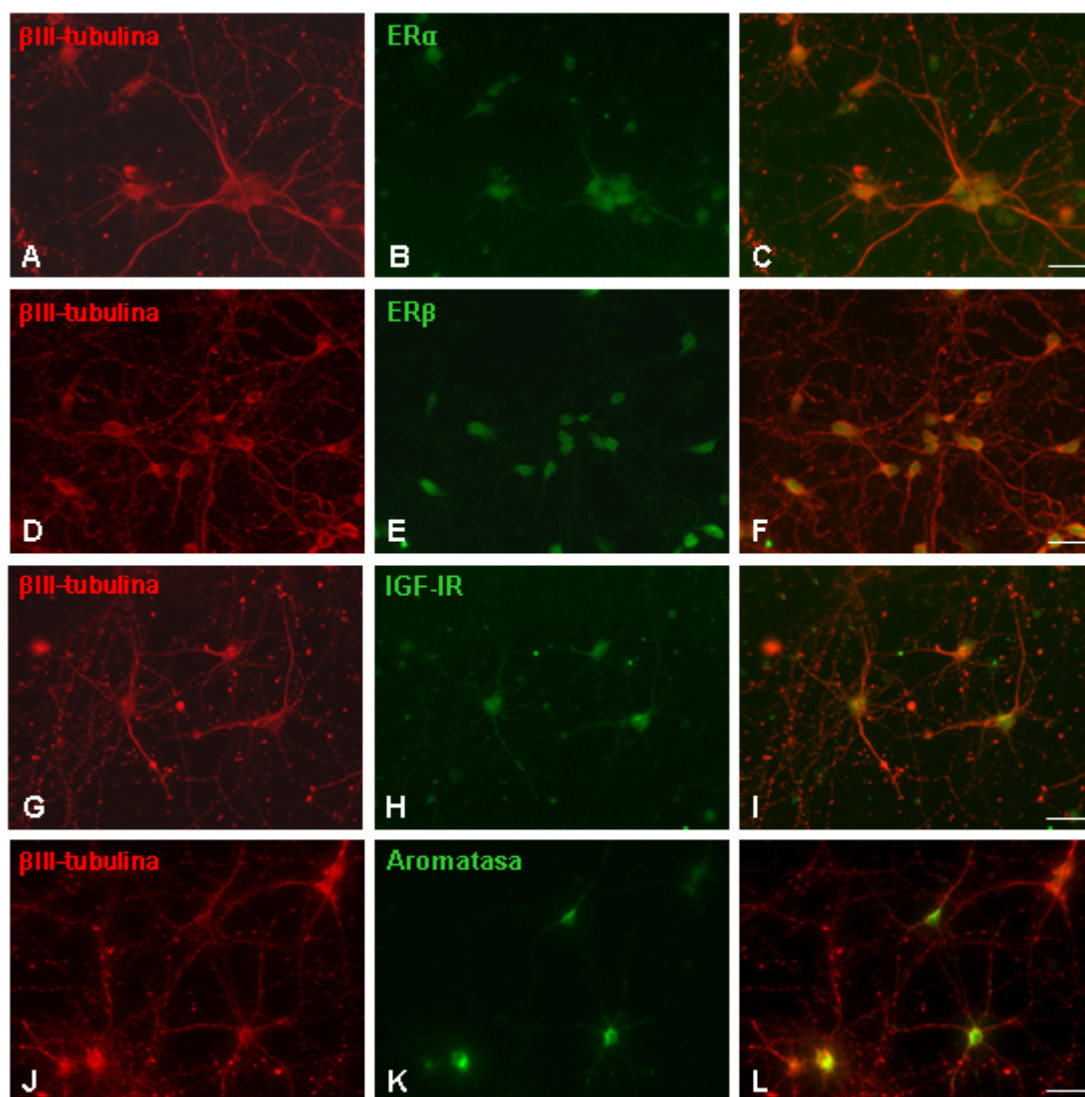


Figura 39. Expresión de la aromatasa, del receptor de IGF-I y de las dos isoformas del receptor de estrógeno, en neuronas de corteza tratadas con vehículo. **A-C)** Expresión de $ER\alpha$. β III-tubulina se marcó en rojo y $ER\alpha$ en verde. **D-F)** Expresión de $ER\beta$. β III-tubulina se marcó en rojo y $ER\beta$ en verde. **G-I)** Expresión de IGF-IR. β III-tubulina se marcó en rojo e IGF-IR en verde. **J-L)** Expresión de aromatasa. β III-tubulina se marcó en rojo y aromatasa en verde. La barra de escala corresponde a 25 μ m.

RESULTADOS

En cuanto al receptor de IGF-I, su marcaje fue detectado en toda la célula tanto en astrocitos como en neuronas, aunque en los astrocitos hubo cierta predominancia en la localización nuclear (Fig 38C y 39C).

Finalmente, tanto en los astrocitos como en las neuronas, la inmunorreactividad para la aromatasa fue citoplasmática y mostró un marcado patrón punteado (Fig 38D y 39D).

4.1 ASTROCITOS DE CORTEZA TOTAL

4.1.1 Vía de la PI3K

La administración de estradiol a una concentración 100nM, independientemente de que se le deje actuar 20 minutos o 28 horas, no tuvo efecto sobre la vía de la PI3K. No se observaron cambios en los niveles de fosforilación de Akt, ni de GSK3 β (Fig 40).

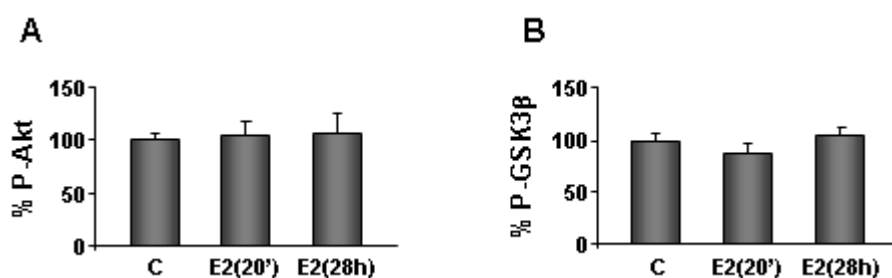


Figura 40. Efecto sobre la vía de la PI3K del tratamiento con estradiol exógeno en astrocitos de corteza.

A) No hubo cambios en el nivel de fosforilación de Akt en respuesta al tratamiento corto o largo con estradiol. **B)** Tampoco se observaron cambios, tras el tratamiento, en el nivel de fosforilación de GSK3 β . C: astrocitos tratados con vehículo; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol.

Por otro lado, el letrozol, no tuvo efecto en sí mismo, pues el nivel de fosforilación de las dos proteínas de la vía de la PI3K, permaneció sin cambios (Fig 41). Sin embargo, la inhibición de la síntesis endógena de estradiol generó una situación basal ante la cual el tratamiento de 28 horas con estradiol fue capaz de incrementar significativamente la fosforilación de Akt y de GSK3 β (Fig 41). Bajo estas mismas condiciones, el tratamiento corto de estradiol no consiguió incrementar la fosforilación de ninguna de las proteínas (Fig 41).

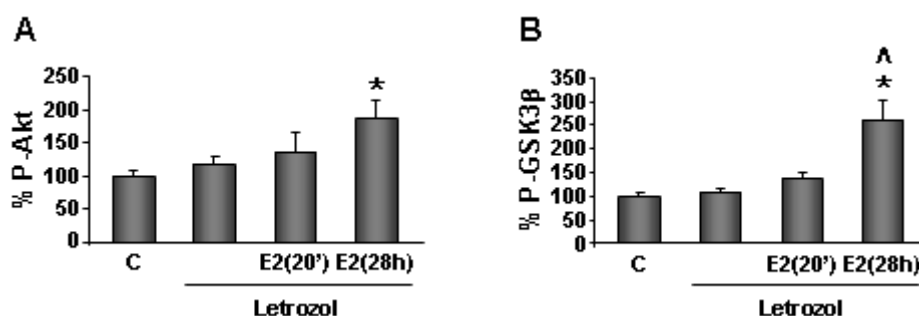


Figura 41. Efecto sobre la vía de la PI3K del bloqueo de la aromatasa y del tratamiento con estradiol exógeno en astrocitos de corteza. A) No hubo cambios en el nivel de fosforilación de Akt por el tratamiento con letrozol. Sin embargo, tras el bloqueo de la aromatasa, el tratamiento de 28 horas con estradiol exógeno aumentó significativamente el nivel de fosforilación de Akt. El tratamiento de 20 minutos no consiguió el mismo efecto **B)** Tampoco se observaron cambios tras el tratamiento con letrozol en el nivel de fosforilación de GSK3β. Pero del mismo modo que ocurre para Akt, en estas circunstancias, el tratamiento de 28 horas con estradiol exógeno, que no el de 20 minutos, promovió la fosforilación de GSK3β. C: astrocitos tratados con vehículo; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17β-estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17β-estradiol. * P<0,05 vs control; ^ P<0,05 vs letrozol (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

Finalmente, la inhibición de los receptores de estrógeno por la administración de ICI182780 durante 20 minutos o 28 horas, no indujo cambios en el nivel de fosforilación de ninguna de las proteínas de la vía (Fig 42 A y B). Por otra parte, la inhibición de los receptores de estrógeno durante 28 horas fue capaz de bloquear el efecto potenciador que el tratamiento de letrozol tiene sobre la capacidad del estradiol de activar la vía (Fig 42 C y D).

RESULTADOS

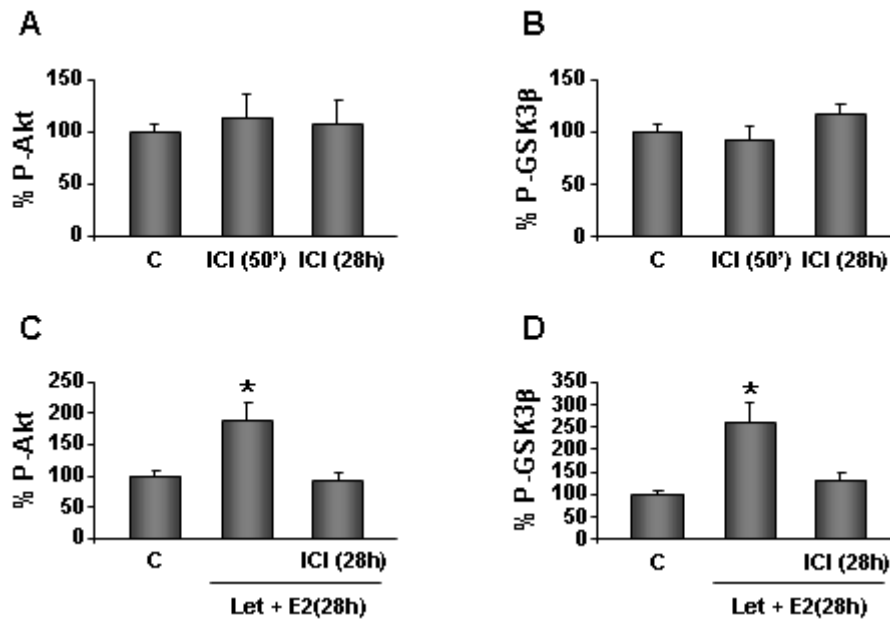


Figura 42. Efecto sobre la vía de la PI3K de la inhibición de los receptores de estrógeno en astrocitos de corteza. **A)** No hubo cambios en el nivel de fosforilación de Akt por el tratamiento con el inhibidor independientemente de la duración de su tratamiento. **B)** Exactamente lo mismo se observó para el nivel de fosforilación de GSK3 β . **C)** El incremento en la fosforilación de Akt que induce el tratamiento de 28 horas con estradiol exógeno en presencia de letrozol, fue bloqueado al inhibir los receptores de estrógeno durante ese mismo tiempo. **D)** Nuevamente, al igual que para Akt, el incremento en la fosforilación de GSK3 β que induce el tratamiento largo de estradiol en presencia de letrozol, se vio bloqueado por el tratamiento de 28 horas con ICI182780. C: astrocitos tratados con vehículo; ICI (50'): astrocitos tratados 50 minutos con ICI182780; ICI (28h): astrocitos tratados 28 horas con ICI182780; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol. * $P < 0,05$ vs control (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

4.1.2 Vía de las MAPKs

La administración de estradiol independientemente del tiempo de actuación, no tuvo efecto sobre la vía de las MAPKs. No se observaron cambios en el nivel de fosforilación de ninguna de las dos isoformas estudiadas de ERK (Fig 43).

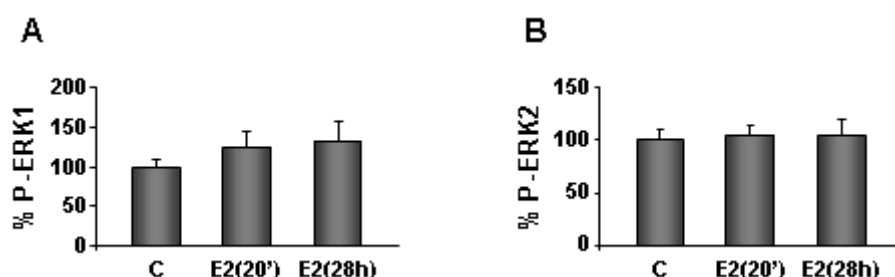


Figura 43. Efecto sobre la vía de las MAPKs del tratamiento con estradiol exógeno en astrocitos de corteza **A)** No hubo cambios en el nivel de fosforilación de ERK1 en respuesta al tratamiento corto o largo con estradiol. **B)** Lo mismo ocurrió con el nivel de fosforilación de ERK2 tras el tratamiento con estradiol exógeno. C: astrocitos tratados con vehículo; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol.

La inhibición de la aromatasa debida al tratamiento con letrozol, no modificó de forma significativa el nivel de fosforilación de ERK1 ni de ERK2 (Fig 44). Sin embargo, nuevamente se observó que bajo la inhibición de la síntesis endógena de estradiol, el tratamiento exógeno de 28 horas con estradiol, inducía un incremento en el nivel de fosforilación de las proteínas de la vía (Fig 44). Bajo esta misma situación, la administración de estradiol durante 20 minutos sólo consiguió incrementar el nivel de fosforilación de ERK2 (Fig 44).

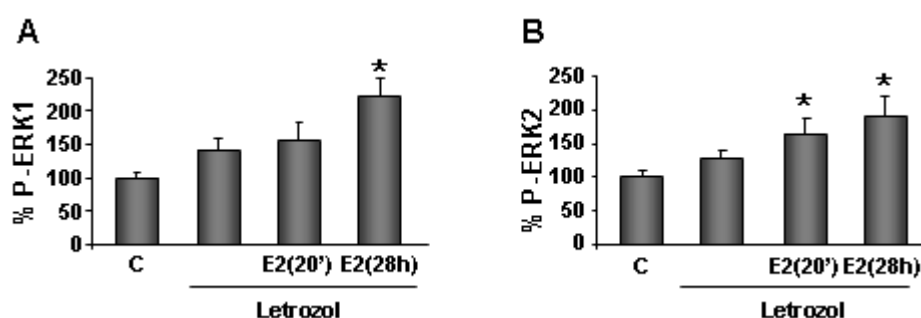


Figura 44. Efecto sobre la vía de las MAPKs del bloqueo de la aromatasa y del tratamiento con estradiol exógeno en astrocitos de corteza. **A)** El tratamiento con letrozol no generó cambios significativos en el nivel de fosforilación de ERK1. Con la inhibición de la aromatasa, el tratamiento de 28 horas con estradiol exógeno incrementó el nivel de fosforilación de ERK1 de tal modo que llegaron a ser diferentes a los detectados en el control. Sin embargo, cuando el tratamiento con estradiol se aplicó sólo durante 20 minutos, no generó un incremento significativo en el nivel de fosforilación de ERK1 **B)** La inhibición de la aromatasa, conseguida por el tratamiento con letrozol, tampoco modificó el nivel de fosforilación de ERK2. Sin embargo, esta inhibición de la síntesis endógena de estradiol permitió que el tratamiento con estradiol exógeno tanto de 20 minutos como de 28 horas, incrementara el nivel de fosforilación de ERK2. C: astrocitos tratados con vehículo; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol. * P<0,05 vs control (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

RESULTADOS

Finalmente, la inhibición de los receptores de estrógeno no provocó cambios sobre el estado de activación de la vía (Fig 45 A y B). Pero esta inhibición sí que fue capaz de bloquear la capacidad de activar la vía que adquiere el estradiol exógeno cuando se ha inhibido la síntesis endógena (Fig 45 C y D).

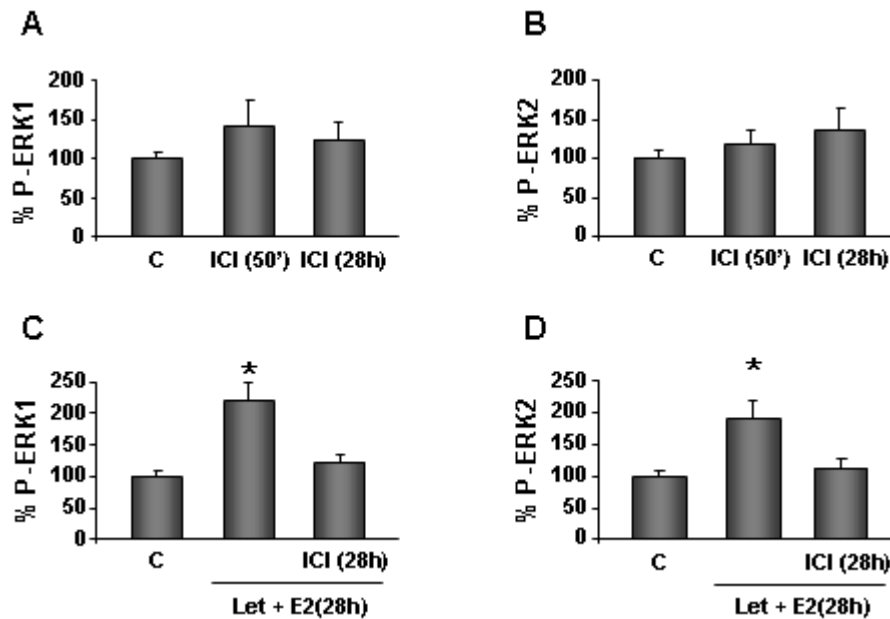


Figura 45. Efecto sobre la vía de las MAPKs de la inhibición de los receptores de estrógeno en astrocitos de corteza. **A)** No hubo cambios en el nivel de fosforilación de ERK1 por el tratamiento con el inhibidor independientemente de la duración de su tratamiento. **B)** Exactamente lo mismo se observó para el nivel de fosforilación de ERK2. **C)** El incremento en la fosforilación de ERK1 que induce el tratamiento de 28 horas con estradiol exógeno en presencia de letrozol, fue bloqueado al inhibir los receptores de estrógeno durante ese mismo tiempo. **D)** Al igual que para ERK1, el incremento en la fosforilación de ERK2 que induce el tratamiento largo de estradiol en presencia de letrozol, se vio bloqueado por el tratamiento con ICI182780 durante 28 horas. C: astrocitos tratados con vehículo; ICI (50'): astrocitos tratados 50 minutos con ICI182780; ICI (28h): astrocitos tratados 28 horas con ICI182780; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol. * P<0,05 vs control (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

4.2 ASTROCITOS DE HIPOCAMPO.

Después de comprobar, que en astrocitos corticales, la acción del estradiol exógeno sobre las vías de la PI3K y de las MAPKs se veía afectada por la actividad de la aromatasa, nos pareció interesante estudiar si esa misma regulación se observaba en los astrocitos de hipocampo.

4.2.1 Vía de la PI3K.

Igual que se observó en los astrocitos de corteza, el tratamiento con estradiol a corto o a largo plazo no tuvo efecto sobre la fosforilación de Akt, ni de GSK3 β (Fig 46).

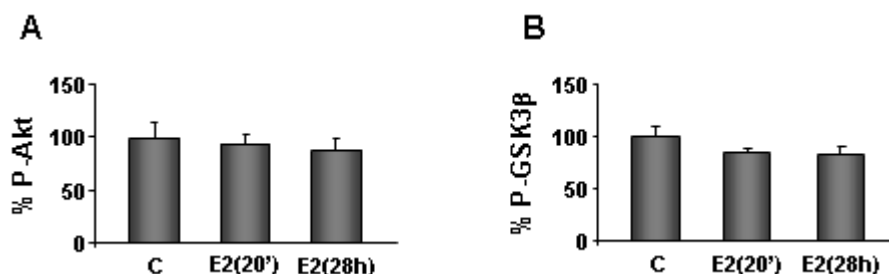


Figura 46. Efecto sobre la vía de la PI3K del tratamiento con estradiol exógeno en astrocitos de hipocampo A) No hubo cambios en el nivel de fosforilación de Akt en respuesta al tratamiento, corto o largo, con estradiol. B) Tampoco se observaron cambios, tras el tratamiento, en el nivel de fosforilación de GSK3 β . C: astrocitos tratados con vehículo; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol.

También en consonancia con los datos de corteza, la inhibición de la aromatasa no alteró la situación basal de la vía (Fig 47). Sin embargo, el tratamiento con letrozol de los astrocitos de hipocampo, no permitió que el estradiol exógeno administrado durante 28 horas regulara el estado de activación de la vía de la PI3K (Fig 47).

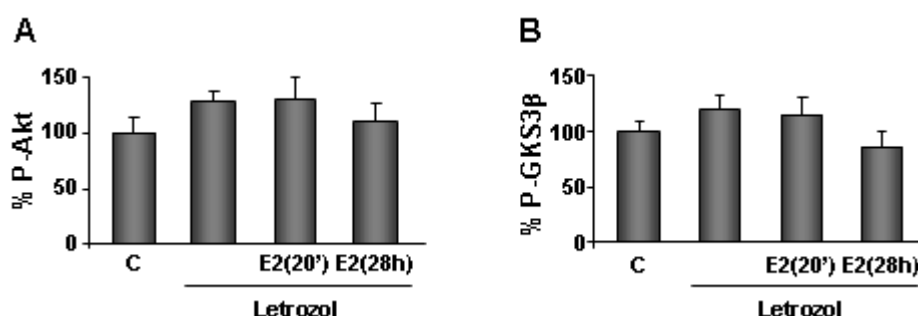


Figura 47. Efecto sobre la vía de la PI3K del bloqueo de la aromatasa y del tratamiento con estradiol exógeno en astrocitos de hipocampo. A) No hubo cambios en el nivel de fosforilación de Akt por el tratamiento con letrozol. Con el bloqueo de la aromatasa, el tratamiento de 28 horas o de 20 minutos con estradiol exógeno no modificó el nivel de fosforilación de Akt. B) Los mismos resultados se obtuvieron para el nivel de fosforilación de GSK3 β . No se observaron cambios tras el tratamiento con letrozol en sus niveles de fosforilación y bajo estas circunstancias el tratamiento con estradiol exógeno, ya sea de 20 minutos o de 28 horas, no modificó el estado de activación de la proteína. C: astrocitos tratados con vehículo; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol.

RESULTADOS

4.2.2 Vía de las MAPKs.

El tratamiento con estradiol, ya sea largo o corto, no modificó el nivel de fosforilación de ninguna de las dos isoformas de ERK (Fig 48).

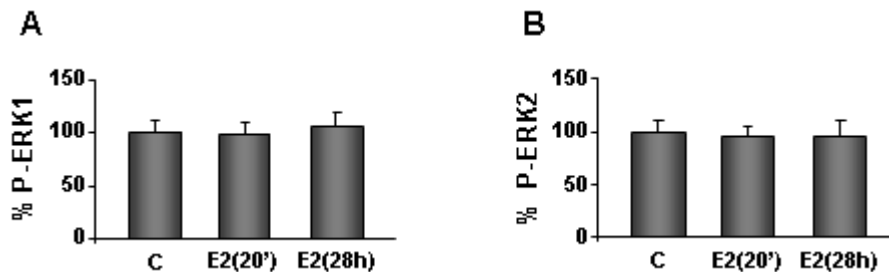


Figura 48. Efecto sobre la vía de las MAPKs del tratamiento con estradiol exógeno en astrocitos de hipocampo A) No hubo cambios en el nivel de fosforilación de ERK1 en respuesta al tratamiento corto o largo con estradiol. B) Lo mismo ocurrió con el nivel de fosforilación de ERK2, tras el tratamiento. C: astrocitos tratados con vehículo; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol.

El tratamiento con letrozol no tuvo efecto sobre el estado de activación de la vía, como se comprobó por la ausencia de cambios en el nivel de fosforilación de ERK1 y de ERK2, tras la inhibición de la aromatasa (Fig 49). Además, bajo esta situación, el aporte de estradiol exógeno durante 20 minutos o 28 horas tampoco modificó las condiciones basales de la vía de las MAPKs (Fig 49).

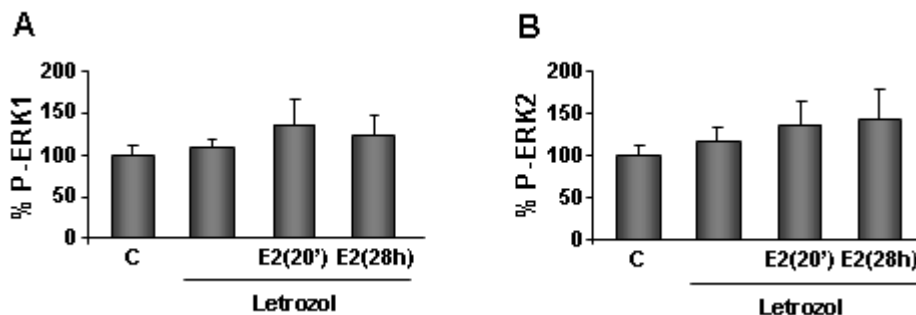


Figura 49. Efecto sobre la vía de las MAPKs del bloqueo de la aromatasa y del tratamiento con estradiol exógeno en astrocitos de hipocampo. A) No hubo cambios en el nivel de fosforilación de ERK1 por el tratamiento con letrozol. Tras el bloqueo de la aromatasa, ninguno de los tratamientos con estradiol exógeno modificó el nivel de fosforilación de ERK1. B) Lo mismo ocurrió con ERK2. No se observaron cambios tras el tratamiento con letrozol en su nivel de fosforilación y bajo estas circunstancias el tratamiento con estradiol exógeno, ya sea de 20 minutos o de 28 horas, no modificó el estado de activación de la proteína. C: astrocitos tratados con vehículo; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol.

4.3 NEURONAS DE CORTEZA TOTAL.

Después de comprobar que la regulación de las vías de la PI3K y de las MAPKs observada en astrocitos de corteza, no se reproducía en astrocitos de hipocampo, nos planteamos volver a la corteza, para ver si en lugar de ser una regulación asociada al tipo celular, era una regulación dependiente de la región cerebral. Así pues realizamos los mismos tratamientos, pero esta vez en neuronas de corteza, a fin de investigar dicha hipótesis.

4.3.1 Vía de la PI3K.

Igual que se observó en los astrocitos de esta región cerebral, la administración de estradiol independientemente de que se le deje actuar 20 minutos o 28 horas, no indujo cambios en el nivel de fosforilación de Akt o de GSK3 β (Fig 50).

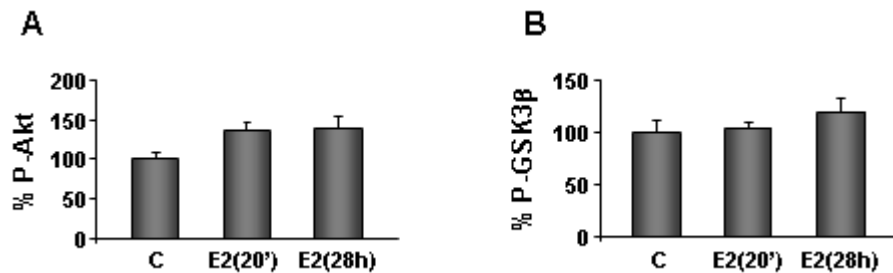


Figura 50. Efecto sobre la vía de la PI3K del tratamiento con estradiol exógeno en neuronas de corteza A) No hubo cambios en el nivel de fosforilación de Akt en respuesta al tratamiento corto o largo de estradiol. **B)** Tampoco se observaron cambios en el nivel de fosforilación de GSK3 β tras el tratamiento con estradiol independientemente de su duración. C: neuronas tratadas con vehículo; E2(20'): neuronas tratadas 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): neuronas tratadas 28 horas con 17 β -estradiol.

El tratamiento con letrozol, no generó cambios sobre el estado de activación de la vía de la PI3K (Fig 51). Pero además, una vez que se inhibió la aromatasa, el tratamiento con estradiol a corto o largo plazo, tampoco cambió el nivel de fosforilación de Akt o de GSK3 β (Fig 51).

RESULTADOS

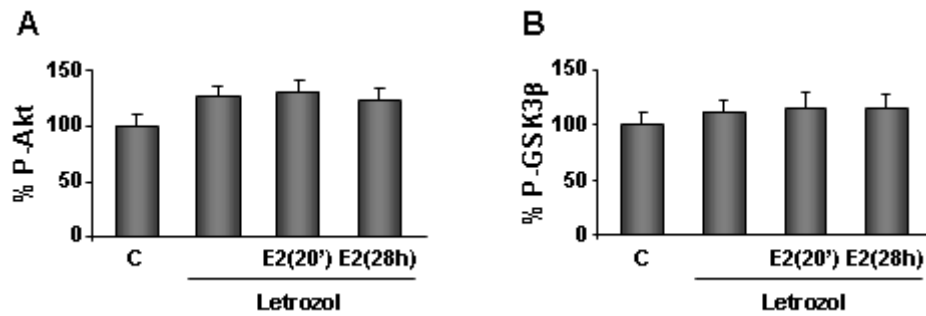


Figura 51. Efecto sobre la vía de la PI3K del bloqueo de la aromatasa y del tratamiento con estradiol exógeno en neuronas de corteza. A) No hubo cambios en el nivel de fosforilación de Akt por el tratamiento con letrozol. Con el bloqueo de la aromatasa, el tratamiento de 28 horas o de 20 minutos con estradiol exógeno, tampoco modificó el nivel de fosforilación de Akt. **B)** Los mismos resultados se obtuvieron para el nivel de fosforilación de GSK3 β . No se observaron cambios tras el tratamiento con letrozol en sus niveles de fosforilación y bajo estas circunstancias el tratamiento con estradiol exógeno, ya sea de 20 minutos o de 28 horas, no modificó el estado de activación de la proteína. C: neuronas tratadas con vehículo; E2(20'): neuronas tratadas 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): neuronas tratadas 28 horas con 17 β -estradiol.

4.3.2 Vía de las MAPKs.

Los niveles de fosforilación de ERK1/2 que se observaron en las neuronas de corteza tratadas durante 20 minutos o 28 horas con estradiol, no mostraron diferencias significativas con los niveles detectados en las neuronas tratadas con vehículo (Fig 52).

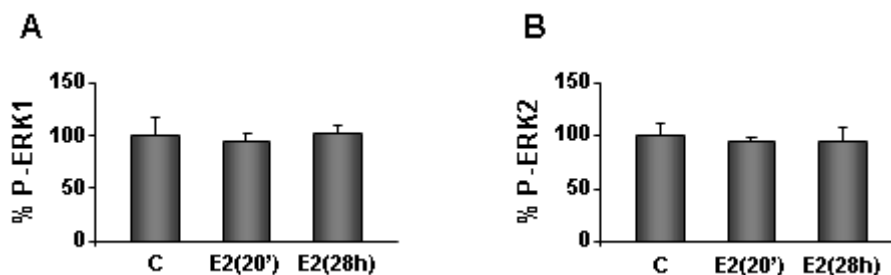


Figura 52. Efecto sobre la vía de las MAPKs del tratamiento con estradiol exógeno en neuronas de corteza A) No hubo cambios en el nivel de fosforilación de ERK1 en respuesta al tratamiento corto o largo con estradiol. **B)** Tampoco se observaron cambios en el nivel de fosforilación de ERK2 tras el tratamiento con estradiol independientemente de su duración. C: neuronas tratadas con vehículo; E2(20'): neuronas tratadas 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): neuronas tratadas 28 horas con 17 β -estradiol.

La inhibición de la aromatasa por si sola, generó un incremento en el nivel de fosforilación de ERK1 y de ERK2 (Fig 53). Ante esta situación, un tratamiento de 28

horas con estradiol fue capaz de restablecer el nivel de fosforilación de las dos proteínas observado en el grupo control (Fig 53).

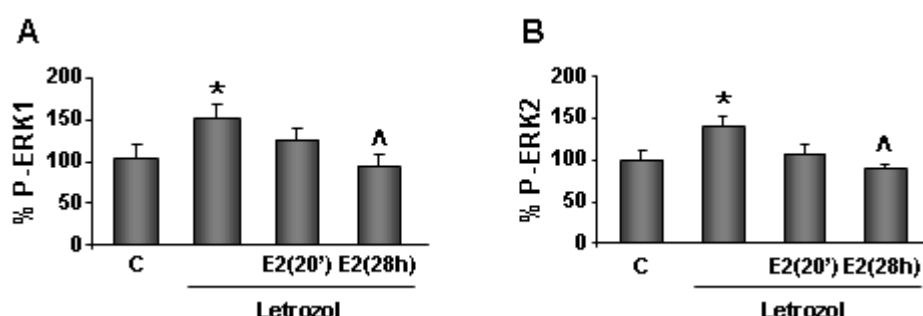


Figura 53. Efecto sobre la vía de las MAPKs del bloqueo de la aromatasa y del tratamiento con estradiol exógeno en neuronas de corteza. A) El nivel de fosforilación de ERK1 se vio incrementado por el tratamiento con letrozol. El tratamiento de 28 horas con estradiol exógeno consiguió bloquear el efecto del letrozol restableciendo el nivel basal de fosforilación de ERK1. El tratamiento de 20 minutos con estradiol no consiguió esta recuperación. **B)** Los mismos resultados se obtuvieron para el nivel de fosforilación de ERK2. El tratamiento con letrozol incrementó sus niveles de fosforilación y bajo este tratamiento la adición de estradiol exógeno durante 28 horas, restableció el nivel basal de activación de la proteína. El tratamiento corto con estradiol no consiguió esta recuperación. C: neuronas tratadas con vehículo; E2(20'): neuronas tratadas 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): neuronas tratadas 28 horas con 17 β -estradiol. * $P < 0,05$ vs control; ^ $P < 0,05$ vs letrozol (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

Para ver si la inhibición de los receptores de estrógeno generaba el mismo efecto que el bloqueo de la aromatasa, se realizó un tratamiento con ICI182780. Pero independientemente de la duración del tratamiento, no se observaron cambios en los niveles de fosforilación de ERK1 ni de ERK2 en respuesta a la inhibición de los receptores de estrógeno (Fig 54).

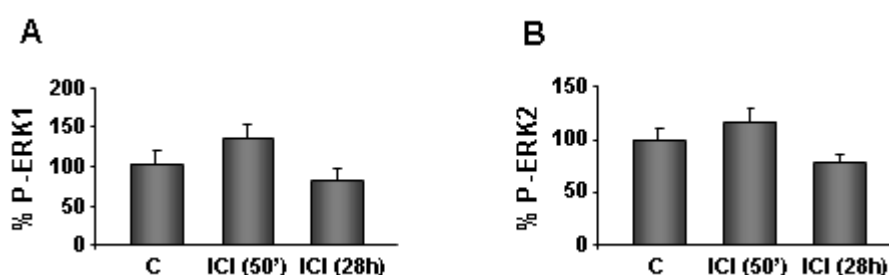


Figura 54. Efecto sobre la vía de las MAPKs de la inhibición de los receptores de estrógenos en neuronas de corteza. A) No hubo cambios significativos en el nivel de fosforilación de ERK1 por el tratamiento con el inhibidor de los ERs, independientemente de la duración del mismo. **B)** El nivel de fosforilación de ERK2 tampoco se vio modificado significativamente por la inhibición de los receptores. C: neuronas tratadas con vehículo; ICI (50'): neuronas tratadas 50 minutos con ICI182780; ICI (28h): neuronas tratadas 28 horas con ICI182780.

RESULTADOS

5. ESTUDIO DEL EFECTO DEL IGF-I SOBRE LAS VÍAS DE PI3K Y MAPK EN ASTROCITOS Y NEURONAS Y DE SU INTERACCIÓN CON LA ACTIVIDAD AROMATASA Y EL ESTRADIOL EXÓGENO

Una vez analizada la capacidad de la aromatasa, de regular la activación de las vías de señalización de la PI3K y de las MAPKs por el estradiol, quisimos estudiar si el efecto que el IGF-I tiene sobre ellas, se veía afectado por esta regulación de la aromatasa sobre el estradiol.

Así pues, para analizar el efecto del IGF-I, lo administramos a una concentración final de 100nM y dejamos que actuara durante 20 minutos antes de lisar las células. Los cotratamientos con estradiol, letrozol o ICI182780, similares a los del estudio anterior, vienen detallados en el apartado correspondiente de “Material y Métodos”.

5.1 ASTROCITOS DE CORTEZA TOTAL.

5.1.1 Vía de la PI3K.

El tratamiento con IGF-I activó la vía de la PI3K, induciendo un incremento en la fosforilación de Akt y de GSK3 β (Fig 55). La adición a este tratamiento de estradiol, ya fuera durante 20 minutos o durante 28 horas, no modificó el efecto que el IGF-I tiene sobre la vía (Fig 55).

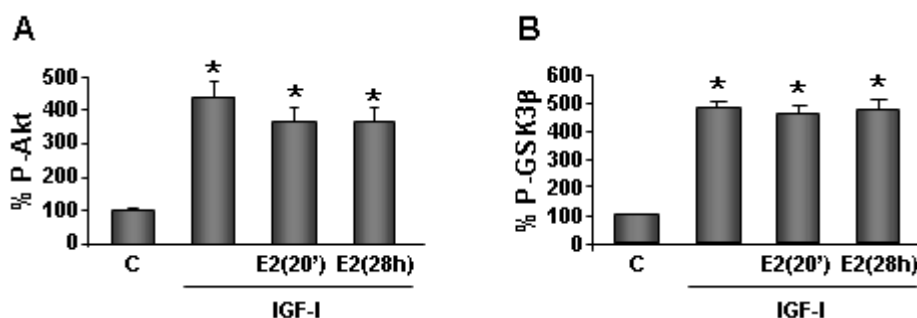


Figura 55. Efecto sobre la vía de la PI3K del tratamiento con IGF-I solo o junto con estradiol exógeno en astrocitos de corteza. **A)** El IGF-I indujo un incremento en el nivel de fosforilación de Akt. Dicho efecto no se vio modificado por el cotratamiento con estradiol, independientemente de que éste fuera administrado durante 20 minutos o 28 horas. **B)** Lo mismo ocurrió con el nivel de fosforilación de GSK3 β : el tratamiento con IGF-I los incrementó significativamente y dicho efecto no fue modificado por la adición de estradiol independientemente de la duración del tratamiento. C: astrocitos tratados con vehículo; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol; IGF-I: astrocitos tratados 20 minutos con IGF-I. * P<0,05 vs control (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

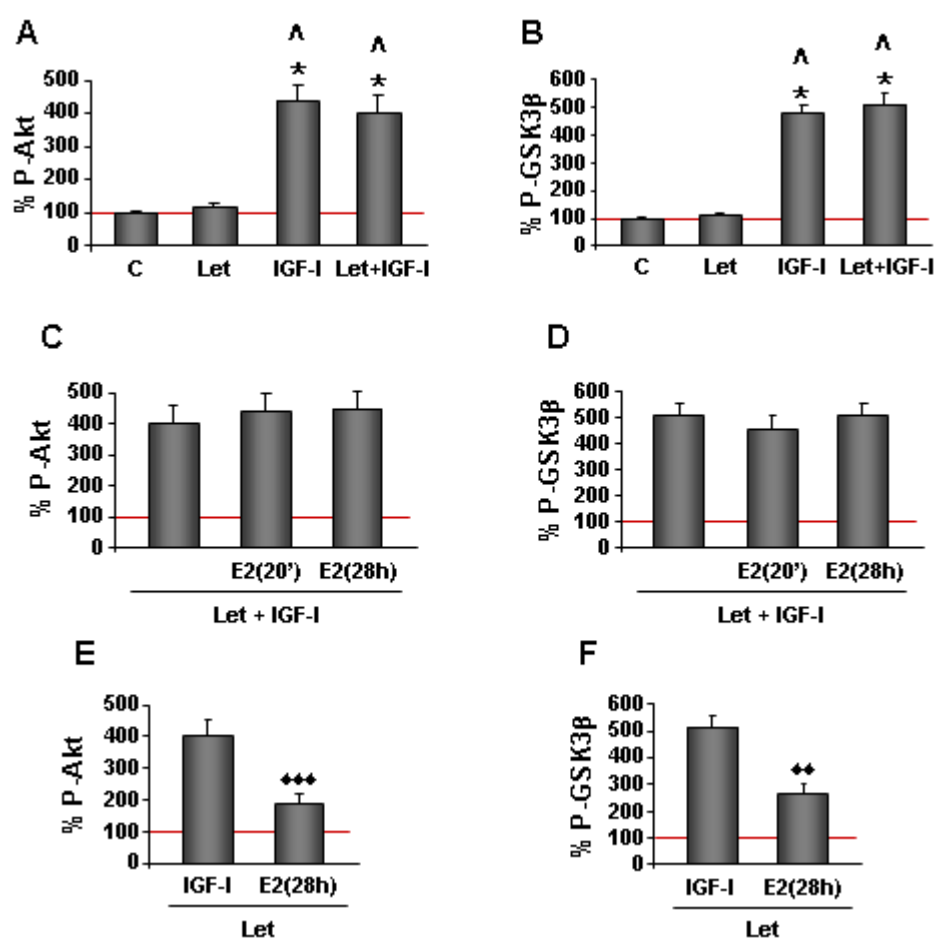


Figura 56. Efecto sobre la vía de la PI3K del tratamiento con IGF-I, tras el bloqueo de la aromatasa y con la adición de estradiol exógeno en astrocitos de corteza. **A)** El tratamiento con letrozol, no modificó la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de Akt. **B)** El nivel de fosforilación de GSK3β que el IGF-I induce, tampoco fue modificado por el tratamiento con letrozol. **C)** Con la inhibición de la aromatasa, un cotratamiento de estradiol exógeno e IGF-I, independientemente de la duración del tratamiento con estradiol, no cambió la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de Akt. **D)** Exactamente lo mismo se observó con el nivel de fosforilación de GSK3β. **E)** Con la inhibición de la aromatasa, el tratamiento con IGF-I indujo un incremento en el nivel de fosforilación de Akt significativamente mayor del que consiguió el tratamiento de 28 horas con estradiol exógeno. **F)** En el nivel de fosforilación de GSK3β se observó lo mismo que en los de Akt. C: astrocitos tratados con vehículo; Let: astrocitos tratados 28 horas con letrozol; IGF-I: astrocitos tratados 20 minutos con IGF-I; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17β-estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17β-estradiol. En las figuras C-F, la línea roja indica el nivel del control. * P<0,05 vs control; ^ P<0,05 vs Let (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn). ♦♦ P<0,01 vs Let+IGF-I; ♦♦♦ P<0,001 vs Let+IGF-I (Test de Mann-Whitney).

Por otro lado, la administración de letrozol tampoco modificó la capacidad del IGF-I de activar la vía de la PI3K (Fig 56 A y B). Teniendo en cuenta los resultados

RESULTADOS

obtenidos en el estudio anterior, en el que la administración de estradiol exógeno durante 28 horas en presencia de letrozol fue capaz de activar la vía de la PI3K, nos pareció interesante comprobar si en estas mismas circunstancias el estradiol regulaba de alguna manera el efecto del IGF-I. Los niveles de fosforilación que este triple tratamiento indujo en Akt y en GSK3 β no mostraron diferencias con los que el IGF-I promueve por si solo (Fig 56 C y D). Una posible explicación de esta falta de cooperación entre los dos tratamientos podría darla el hecho de que el nivel de fosforilación que en ambas proteínas indujo el IGF-I en presencia del letrozol es significativamente mayor al que consiguió el tratamiento conjunto de estradiol y letrozol (Fig 56 E y F).

Finalmente, la inhibición de los receptores de estrógeno con ICI182780, independientemente de la duración del tratamiento, no modificó la capacidad del IGF-I de activar la vía de la PI3K (Fig 57).

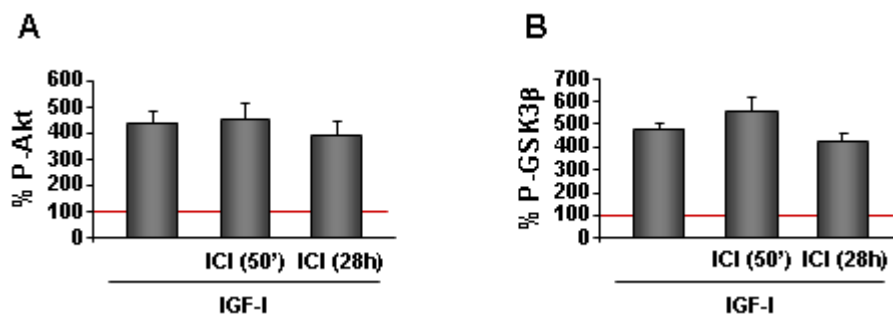


Figura 57. Efecto sobre la vía de la PI3K del tratamiento con IGF-I bajo la inhibición de los receptores de estrógeno en astrocitos de corteza. A) La inhibición de los receptores de estrógeno con ICI182780 independientemente de la duración del tratamiento, no modificó la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de Akt. **B)** El tratamiento con ICI182780, ya fuera de 50 minutos o 28 horas, no modificó el nivel de fosforilación de GSK3 β que se alcanzó tras el tratamiento con IGF-I. C: astrocitos tratados con vehículo; ICI (50'): astrocitos tratados 50 minutos con ICI182780; ICI (28h): astrocitos tratados 28 horas con ICI182780. La línea roja indica el nivel del control.

5.1.2 Vía de las MAPKs.

El tratamiento con IGF-I activó la vía de las MAPKs, incrementando los niveles de fosforilación de ERK1/2 (Fig 58). Dicho incremento no se vio modificado por la administración de estradiol exógeno independientemente de que se aplicara durante 20 minutos o 28 horas (Fig 58).

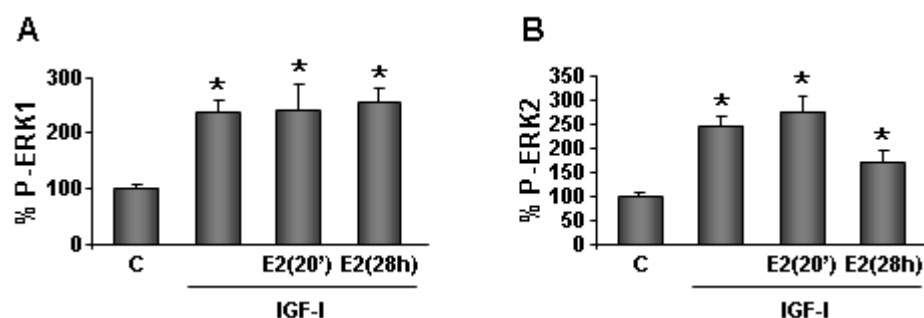


Figura 58. Efecto sobre la vía de las MAPKs del tratamiento con IGF-I solo o junto con estradiol exógeno en astrocitos de corteza. A) En respuesta al tratamiento con IGF-I se observó un incremento en el nivel de fosforilación de ERK1, que no se vio modificado por el cotratamiento con estradiol, independientemente de la duración del mismo. **B)** El nivel de fosforilación de ERK2 también se vio incrementado tras el tratamiento con IGF-I y dicho efecto no fue modificado por la adición de estradiol, independientemente de que fuera durante 20 minutos o 28 horas. C: astrocitos tratados con vehículo; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol; IGF-I: astrocitos tratados 20 minutos con IGF-I. * P<0,05 vs control (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

La inhibición de la síntesis endógena de estradiol, mediante el tratamiento con letrozol, generó una situación basal, en la que el tratamiento con IGF-I produjo un incremento en el nivel de fosforilación de ERK1 de mayor magnitud que el que en condiciones normales genera el IGF-I (Fig 59 A). En presencia de letrozol, también se observó un incremento en la capacidad del IGF-I de aumentar el nivel de fosforilación de ERK2, pero este incremento no mostró diferencias significativas con la activación que el IGF-I es capaz de inducir en condiciones normales (Fig 59 B).

La adición de estradiol durante 20 minutos, al tratamiento de letrozol e IGF-I, indujo una disminución en el nivel de fosforilación de ERK1 de tal modo que se igualó al encontrado en los astrocitos tratados sólo con IGF-I (Fig 59 C). Por otro lado, cuando la adición de estradiol fue durante 28 horas, no se observaron cambios significativos en el nivel de fosforilación de ERK1 (Fig 59 C). El nivel de fosforilación de ERK2 alcanzado en respuesta al IGF-I, que no fue modificado por el tratamiento con letrozol, tampoco se vio alterado por la adición de estradiol exógeno, independientemente de que se le dejara actuar durante 20 minutos o 28 horas (Fig 59 D).

RESULTADOS

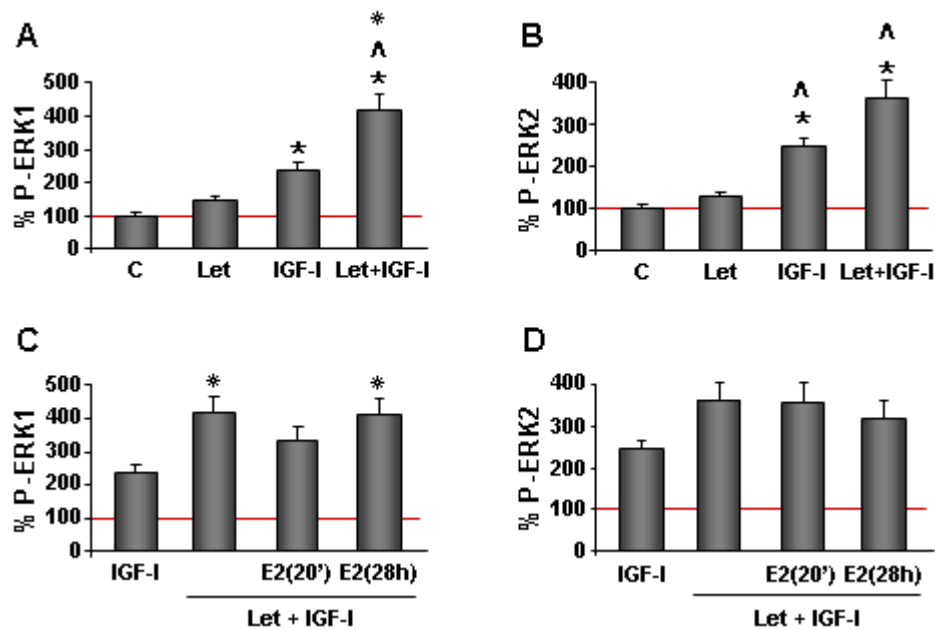


Figura 59. Efecto sobre la vía de las MAPKs del tratamiento con IGF-I, tras el bloqueo de la aromatasa y con la adición de estradiol exógeno en astrocitos de corteza. A) El tratamiento con letrozol, potenció la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de ERK1 de tal manera que se alcanzaron valores diferentes, no sólo al grupo control y al tratado con letrozol, sino también al tratado con IGF-I. **B)** El nivel de fosforilación de ERK2, que el tratamiento con IGF-I es capaz de inducir, no fue modificado significativamente por el tratamiento con letrozol. **C)** Con la inhibición de la aromatasa, el tratamiento de estradiol de 28 horas junto al de IGF-I, no cambió la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de ERK1. Sin embargo, cuando el tratamiento de estradiol fue de 20 minutos, el nivel de fosforilación de ERK1 se vio reducido al nivel que se observó en el grupo tratado sólo con IGF-I. **D)** En el nivel de fosforilación de ERK2 inducido por el tratamiento con IGF-I, no se observó ningún cambio aunque se inhibiera la aromatasa, o bajo dicha situación, se añadiera estradiol durante 20 minutos o 28 horas. C: astrocitos tratados con vehículo; Let: astrocitos tratados 28 horas con letrozol; IGF-I: astrocitos tratados 20 minutos con IGF-I; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol. En las figuras C y D, la línea roja indica el nivel del control. * P<0,05 vs control; ^ P<0,05 vs Let; * P<0,05 vs IGF-I (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

Finalmente, la inhibición de los receptores de estrógeno por el tratamiento con ICI182780, independientemente de que éste fuera de corta o larga duración, no modificó la capacidad del IGF-I de activar la vía de las MAPKs (Fig 60).

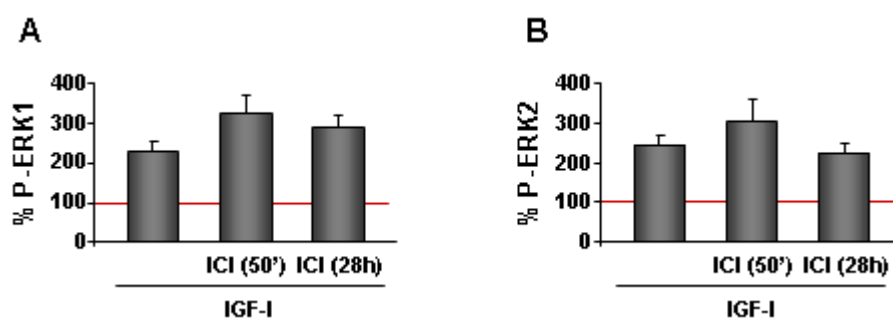


Figura 60. Efecto sobre la vía de las MAPKs del tratamiento con IGF-I, bajo la inhibición de los receptores de estrógeno en astrocitos de corteza. A) El nivel de fosforilación de ERK1 obtenido tras el tratamiento con IGF-I no fue modificado significativamente por el tratamiento con el inhibidor de los receptores de estrógeno, independientemente de la duración de su tratamiento, 50 minutos o 28 horas. **B)** De igual modo, el tratamiento con ICI182780 ya fuera de 50 minutos o 28 horas, no modificó el nivel de fosforilación de ERK2 que se alcanzó tras el tratamiento con IGF-I. C: astrocitos tratados con vehículo; ICI (50'): astrocitos tratados 50 minutos con ICI182780; ICI (28h): astrocitos tratados 28 horas con ICI182780. La línea roja indica el nivel del control.

5.2 ASTROCITOS DE HIPOCAMPO.

5.2.1 Vía de la PI3K.

Al igual que en astrocitos de corteza, la administración de IGF-I incrementó el nivel de fosforilación de Akt y de GSK3 β (Fig 61). Nuevamente, el tratamiento corto o largo con estradiol, no modificó la capacidad del IGF-I de activar esta vía (Fig 61).

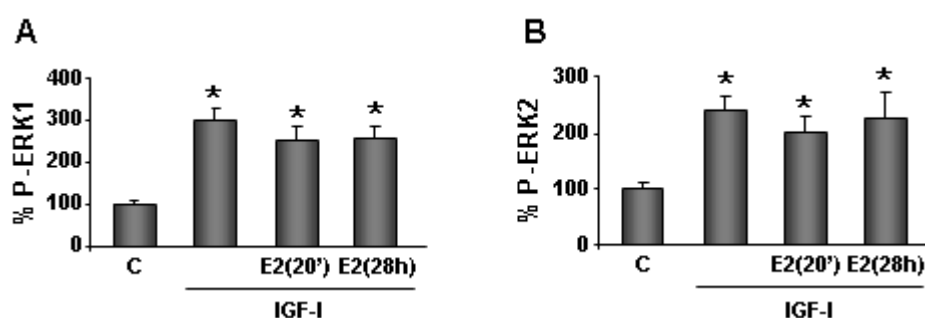


Figura 61. Efecto sobre la vía de la PI3K del tratamiento con IGF-I solo o junto con estradiol exógeno, en astrocitos de hipocampo. A) El nivel de fosforilación de Akt, en respuesta al tratamiento con IGF-I, se vio incrementado significativamente con respecto al control. Dicho incremento, no fue modificado por la administración de estradiol exógeno durante 20 minutos o 28 horas. **B)** El nivel de fosforilación de GSK3 β respondió del mismo modo, aumentó tras el tratamiento con IGF-I y se mantuvo en esos niveles independientemente de que junto con el IGF-I se administrara estradiol exógeno. C: astrocitos tratados con vehículo; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol; IGF-I: astrocitos tratados 20 minutos con IGF-I. * P<0,05 vs control (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

RESULTADOS

La inhibición de la síntesis de estradiol mediante el tratamiento con letrozol, tampoco modificó el efecto del IGF-I sobre la vía de la PI3K (Fig 62 A y B). Ante esta situación, el tratamiento con estradiol exógeno no modificó la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de Akt ni de GSK3 β (Fig 62 C y D).

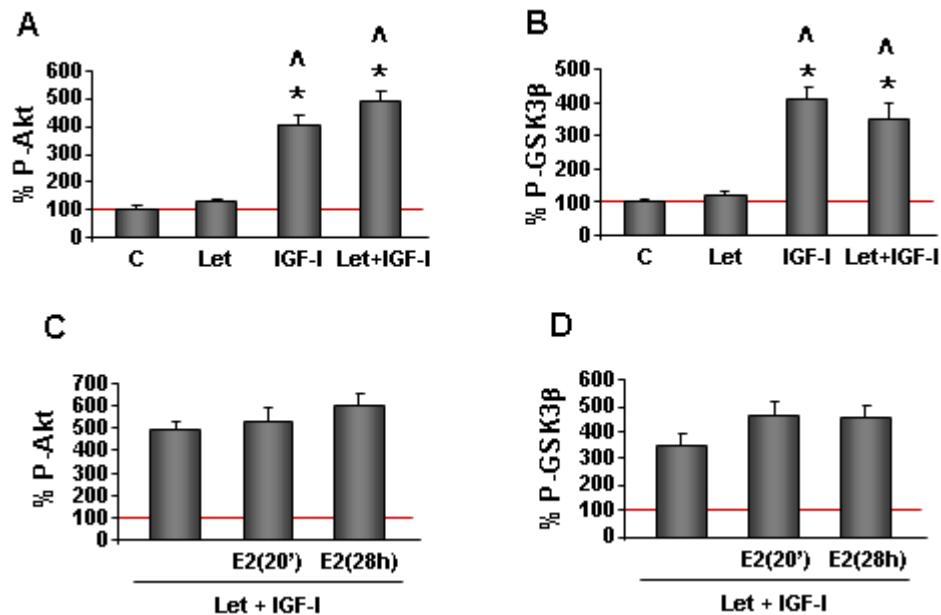


Figura 62. Efecto sobre la vía de la PI3K del tratamiento con IGF-I, tras el bloqueo de la aromatasa y con la adición de estradiol exógeno en astrocitos de hipocampo. **A)** El tratamiento con letrozol, no modificó la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de Akt. **B)** Lo mismo se observó para GSK3 β . El nivel de fosforilación de GSK3 β que se obtuvo tras el tratamiento con IGF-I no fue modificado por la inhibición de la síntesis endógena de estradiol. **C)** Con la inhibición de la aromatasa, el cotratamiento de estradiol exógeno e IGF-I, independientemente de la duración del tratamiento con estradiol, no cambió la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de Akt. **D)** No se observaron cambios en el nivel de fosforilación de GSK3 β , que en presencia de letrozol induce el tratamiento con IGF-I, a pesar de la administración de estradiol exógeno durante 20 minutos o 28 horas. C: astrocitos tratados con vehículo; Let: astrocitos tratados 28 horas con letrozol; IGF-I: astrocitos tratados 20 minutos con IGF-I; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol. En las figuras C y D, la línea roja indica el nivel del control. * P<0,05 vs control; ^ P<0,05 vs Let (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

La inhibición de los receptores de estrógeno no modificó el estado basal de la vía de la PI3K, ni la capacidad del IGF-I de activarla (Fig 63).

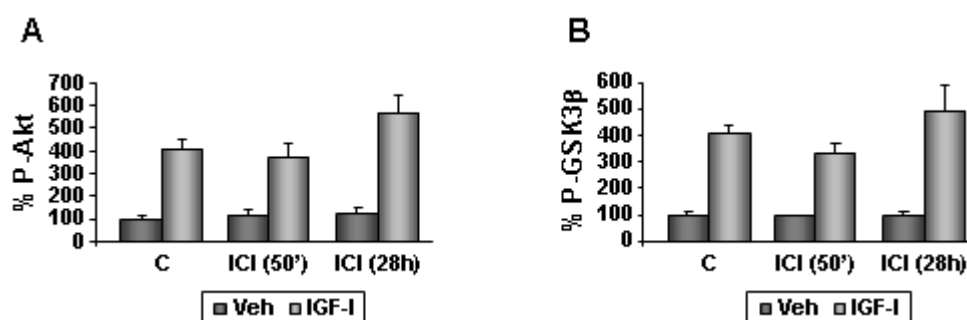


Figura 63. Efecto sobre la vía de la PI3K de la inhibición de los receptores de estrógeno y del tratamiento con IGF-I en astrocitos de hipocampo. **A)** El nivel de fosforilación de Akt no experimentó cambios por el tratamiento con ICI182780. El bloqueo de los receptores de estrógeno, no modificó la capacidad del IGF-I de activar Akt. **B)** El tratamiento con ICI182780 independientemente de su duración, no modificó el nivel de fosforilación de GSK3 β que se detecta en condiciones basales, ni el que el tratamiento con IGF-I es capaz de inducir. C: astrocitos tratados con vehículo; ICI (50'): astrocitos tratados 50 minutos con ICI182780; ICI (28h): astrocitos tratados 28 horas con ICI182780.

5.2.2 Vía de las MAPKs.

El tratamiento con IGF-I, incrementó el nivel de fosforilación de ERK1 y de ERK2 (Fig 64). Dicho incremento, no fue modificado por la adición, durante 20 minutos o 28 horas, de estradiol exógeno (Fig 64).

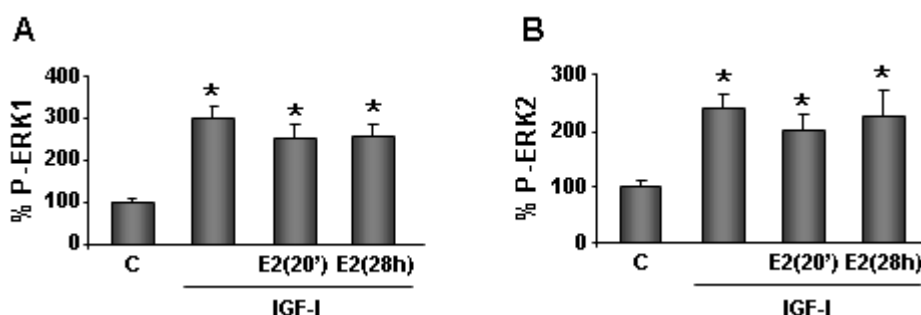


Figura 64. Efecto sobre la vía de las MAPKs del tratamiento con IGF-I solo o junto con estradiol exógeno en astrocitos de hipocampo. **A)** El tratamiento con IGF-I incrementó el nivel de fosforilación de ERK1. Dicho aumento no se vio modificado por la administración de estradiol, durante 20 minutos o 28 horas. **B)** De igual modo, el nivel de fosforilación de ERK2 se vio incrementado tras el tratamiento con IGF-I y dicho efecto no fue modificado por el tratamiento con estradiol exógeno. C: astrocitos tratados con vehículo; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol; IGF-I: astrocitos tratados 20 minutos con IGF-I. * $P < 0,05$ vs control (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

El tratamiento con letrozol, redujo la capacidad del IGF-I de activar la vía de las MAPKs. En ERK1, a pesar de la disminución observada en el nivel de fosforilación, se

RESULTADOS

mantuvieron las diferencias con el grupo control (Fig 65 A). Sin embargo en ERK2, la inhibición de la aromatasa bloqueó completamente la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de dicha proteína (Fig 65 B).

Este bloqueo del efecto del IGF-I sobre la vía de las MAPKs, debido al tratamiento con letrozol, fue contrarrestado por la administración de estradiol exógeno durante 28 horas en el caso de ERK1 (Fig 65 C). Sin embargo, en el caso de ERK2, el tratamiento con estradiol exógeno, independientemente de la duración del mismo, no fue capaz de revertir la pérdida de efecto del IGF-I (Fig 65 D).

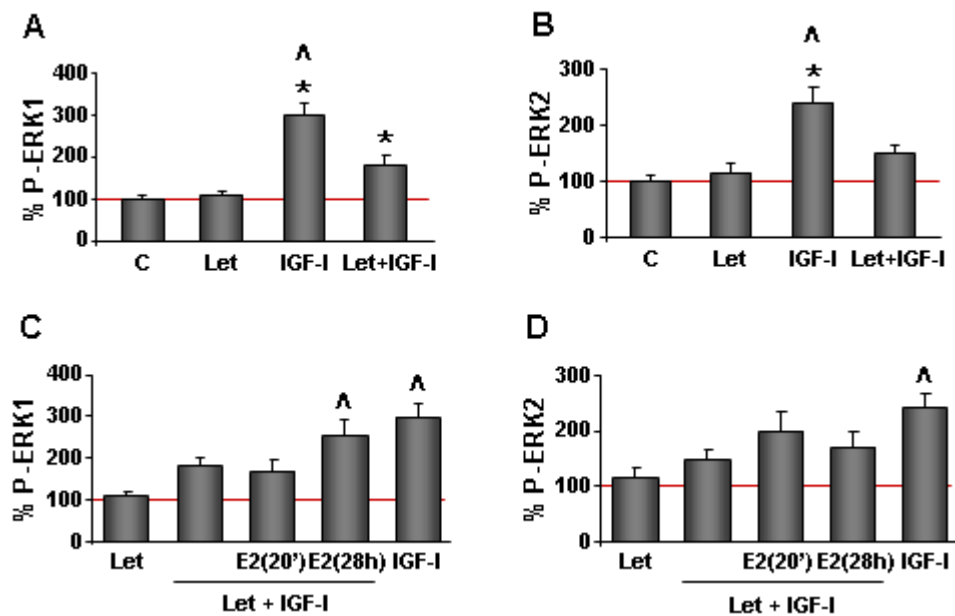


Figura 65. Efecto sobre la vía de las MAPKs del tratamiento con IGF-I, tras el bloqueo de la aromatasa y con la adición de estradiol exógeno en astrocitos de hipocampo. A) El tratamiento con letrozol, redujo la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de ERK1 de tal manera que se mantuvo la diferencia con el grupo control, pero se perdió la existente con el grupo del letrozol. **B)** El tratamiento con letrozol, bloqueó completamente la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de ERK2. **C)** La pérdida de efecto del IGF-I sobre el grado de fosforilación de ERK1, debida a la inhibición de la aromatasa, se recuperó con el tratamiento de 28 horas de estradiol exógeno, pero no con el de 20 minutos. **D)** El bloqueo con letrozol de la capacidad del IGF-I de activar ERK2, no se recuperó, a pesar de la administración de estradiol exógeno, independientemente de la duración del tratamiento. C: astrocitos tratados con vehículo; Let: astrocitos tratados 28 horas con letrozol; IGF-I: astrocitos tratados 20 minutos con IGF-I; E2(20'): astrocitos tratados 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): astrocitos tratados 28 horas con 17 β -estradiol. En las figuras C y D, la línea roja indica el nivel del control. * P<0,05 vs control; ^ P<0,05 vs Let (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

RESULTADOS

Los niveles de fosforilación de ERK1/2 no experimentaron cambios a pesar de la inhibición de los receptores de estrógeno con ICI182780 (Fig 66). De igual modo, el tratamiento con ICI182780 no afectó a la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de ERK1, ni en el tratamiento corto ni en el largo (Fig 66 A). Sin embargo, en el caso del ERK2, la inhibición durante 28 horas de los receptores de estrógeno, produjo una disminución en el nivel de fosforilación de la proteína, a pesar de la presencia de IGF-I (Fig 66 B). Este bloqueo sólo se observó cuando la inhibición fue de 28 horas. La aplicación del ICI182780 durante 20 minutos no tuvo efecto sobre la activación que promueve el IGF-I (Fig 66 B).

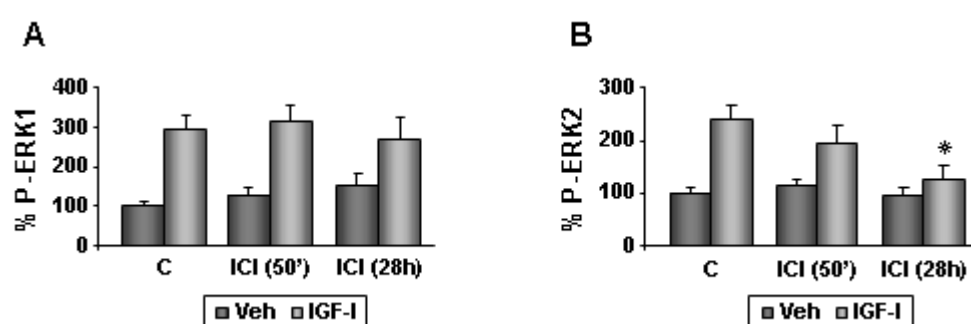


Figura 66. Efecto sobre la vía de las MAPKs de la inhibición de los receptores de estrógeno y del tratamiento con IGF-I en astrocitos de hipocampo. A) El tratamiento con ICI182780, independientemente de su duración, no modificó el nivel de fosforilación de ERK1 que se detecta en condiciones basales, ni el que el tratamiento con IGF-I es capaz de inducir. **B)** El nivel de fosforilación de ERK2 no experimentó cambios por el tratamiento con ICI182780. Por otra parte, el bloqueo de los receptores de estrógeno durante 28 horas, bloqueó la capacidad del IGF-I de activar dicha proteína. C: astrocitos tratados con vehículo; ICI (50'): astrocitos tratados 50 minutos con ICI182780; ICI (28h): astrocitos tratados 28 horas con ICI182780. * $P < 0,05$ vs IGF (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

RESULTADOS

5.3 NEURONAS DE CORTEZA TOTAL.

5.3.1 Vía de la PI3K.

El IGF-I administrado a las neuronas, incrementó significativamente los niveles de fosforilación de Akt y de GSK3 β (Fig 67). Este efecto, no fue modificado por el tratamiento, corto o largo, con estradiol (Fig 67).

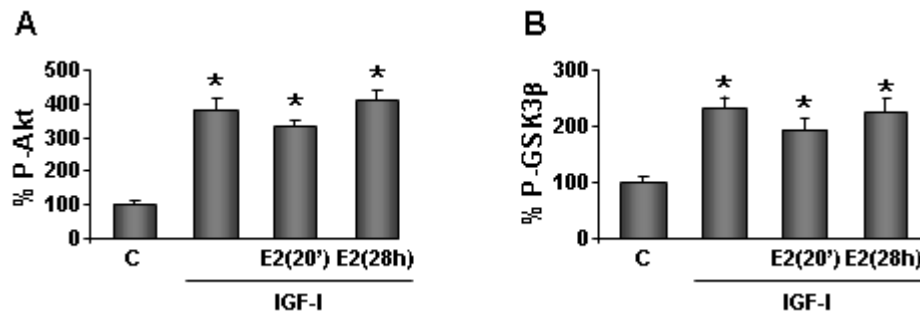


Figura 67. Efecto sobre la vía de la PI3K del tratamiento con IGF-I solo o junto con estradiol exógeno en neuronas de corteza. A) En respuesta al tratamiento con IGF-I se observó un incremento en el nivel de fosforilación de Akt, que no se vio modificado por el cotratamiento con estradiol, independientemente de la duración del mismo. B) El nivel de fosforilación de GSK3 β se vio incrementado tras el tratamiento con IGF-I y dicho efecto no fue modificado por la adición de estradiol independientemente de que fuera durante 20 minutos o 28 horas. C: neuronas tratadas con vehículo; E2(20'): neuronas tratadas 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): neuronas tratadas 28 horas con 17 β -estradiol; IGF-I: neuronas tratadas 20 minutos con IGF-I. * P<0,05 vs control (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

La inhibición de la síntesis endógena de estradiol, mediante el tratamiento con letrozol, no afectó a la capacidad del IGF-I de incrementar los niveles de fosforilación de Akt y de GSK3 β (Fig 68 A y B). Bajo estas condiciones, un tratamiento corto o largo con estradiol exógeno tampoco modificó la capacidad del IGF-I de activar la vía de la PI3K (Fig 68 C y D).

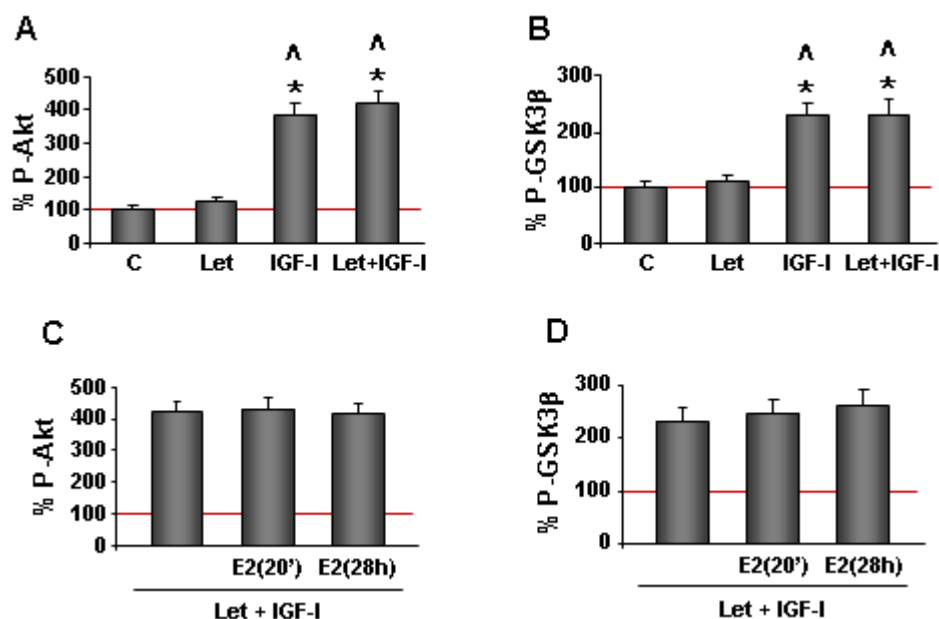


Figura 68. Efecto sobre la vía de la PI3K del tratamiento con IGF-I, tras el bloqueo de la aromatasa y con la adición de estradiol exógeno en neuronas de corteza. **A)** La capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de Akt, no se vio modificada por el tratamiento con letrozol. **B)** Lo mismo se observó para GSK3β. El nivel de fosforilación que indujo el IGF-I no se vio alterado por el tratamiento con letrozol. **C)** Con la inhibición de la aromatasa, el cotratamiento con estradiol exógeno e IGF-I, independientemente de la duración del tratamiento con estradiol, no cambió la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de Akt. **D)** No se observaron cambios en el nivel de fosforilación de GSK3β que con letrozol induce el tratamiento con IGF-I, a pesar de la administración de estradiol exógeno durante 20 minutos o 28 horas. C: neuronas tratadas con vehículo; Let: neuronas tratadas 28 horas con letrozol; IGF-I: neuronas tratadas 20 minutos con IGF-I; E2(20'): neuronas tratadas 20 minutos con 17β-estradiol; E2(28h): neuronas tratadas 28 horas con 17β-estradiol. En las figuras C y D, la línea roja indica el nivel del control. * P<0,05 vs control; ^ P<0,05 vs Let (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

Finalmente, el tratamiento con ICI182780, independientemente de su duración, no tuvo efecto sobre el estado de activación de la vía de la PI3K (Fig 69). No ocurrió así en presencia de IGF-I, ya que, la inhibición del receptor de estrógeno durante 50 minutos potenció la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de Akt (Fig 69). Por otro lado, el nivel de fosforilación de GSK3β inducido por el IGF-I se vio incrementado debido a la inhibición de los receptores de estrógeno, tanto con el tratamiento corto de ICI182780, como con el largo (Fig 69).

RESULTADOS

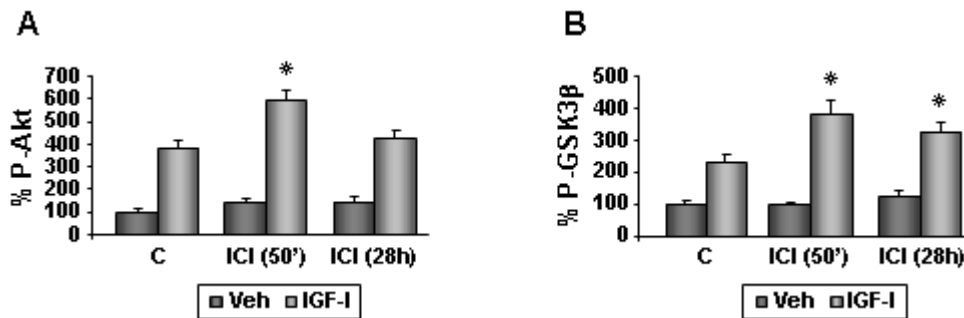


Figura 69. Efecto sobre la vía de la PI3K de la inhibición de los receptores de estrógeno y del tratamiento con IGF-I en neuronas de corteza. A) El tratamiento con ICI182780, independientemente de su duración, no modificó el nivel de fosforilación de Akt que se detecta en condiciones basales. Sin embargo, el tratamiento corto con ICI182780, incrementó la capacidad del IGF-I de activar dicha proteína. B) El nivel basal de fosforilación de GSK3 β no experimentó cambios por el tratamiento con ICI182780. Sin embargo, la inhibición de los receptores de estrógeno, independientemente de su duración, sí que potenció la capacidad del IGF-I de incrementar la fosforilación de GSK3 β . C: neuronas tratadas con vehículo; ICI (50'): neuronas tratadas 50 minutos con ICI182780; ICI (28h): neuronas tratadas 28 horas con ICI182780. * $P < 0,05$ vs IGF (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

5.3.2 Vía de las MAPKs.

En neuronas, el tratamiento con IGF-I actuó sobre la vía de las MAPKs e incrementó los niveles de fosforilación de ERK1/2 (Fig 70). Dicha activación de la vía, no se vio modificada por la administración de estradiol exógeno, independientemente de la duración del tratamiento (Fig 70).

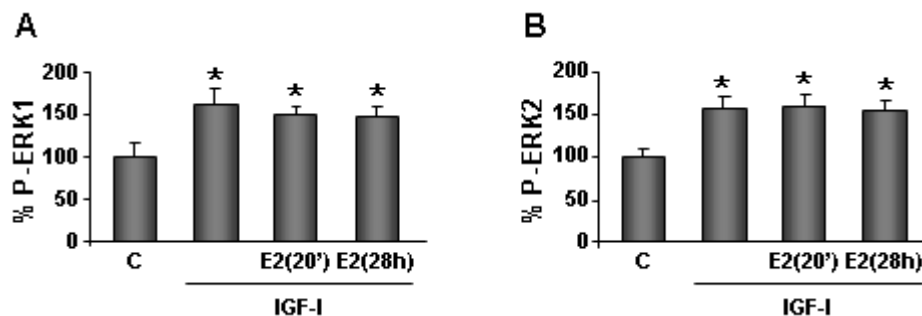


Figura 70. Efecto sobre la vía de las MAPKs del tratamiento con IGF-I, solo o junto con estradiol exógeno en neuronas de corteza. A) Tras el tratamiento con IGF-I se observó un incremento en el nivel de fosforilación de ERK1, que no se vio modificado por la administración de estradiol exógeno, durante 20 minutos o 28 horas. B) El nivel de fosforilación de ERK2 también se vio incrementado tras el tratamiento con IGF-I y dicho efecto no fue modificado por la adición de estradiol exógeno al tratamiento independientemente de la duración del mismo. C: neuronas tratadas con vehículo; E2(20'): neuronas tratadas 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): neuronas tratadas 28 horas con 17 β -estradiol; IGF-I: neuronas tratadas 20 minutos con IGF-I. * $P < 0,05$ vs control (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

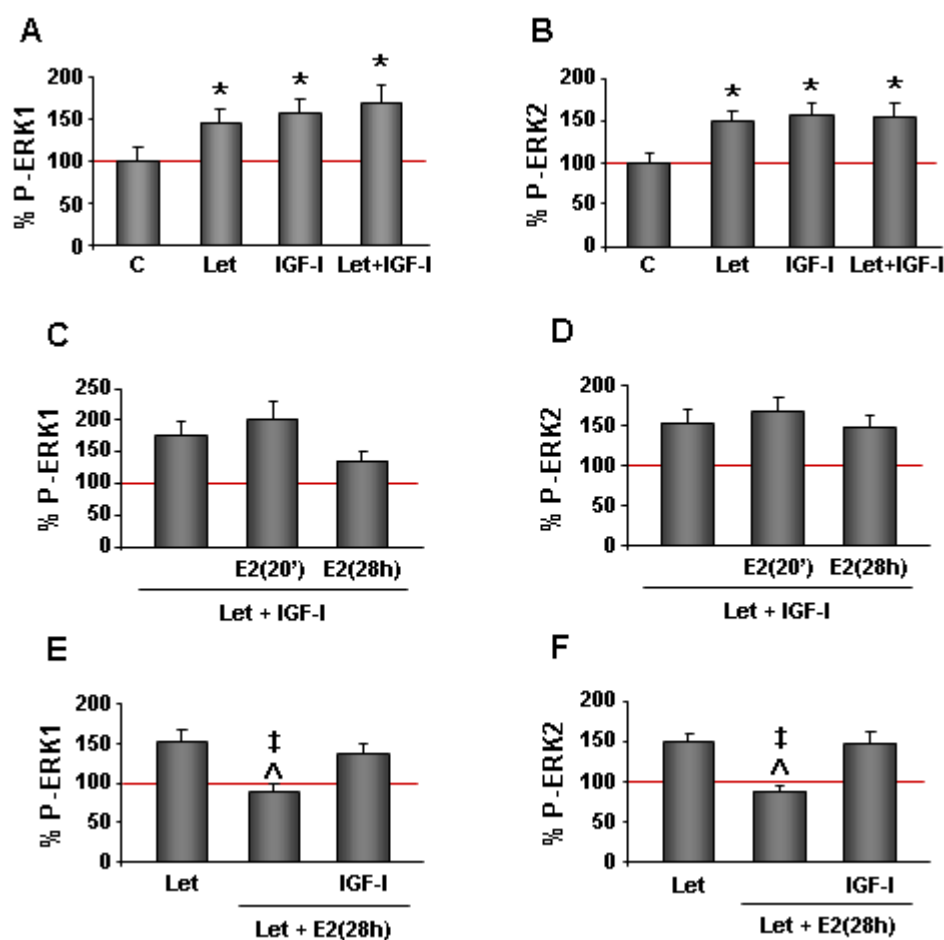


Figura 71. Efecto sobre la vía de las MAPKs del tratamiento con IGF-I, tras el bloqueo de la aromatasa y con la adición de estradiol exógeno en neuronas de corteza. **A)** El tratamiento con letrozol, indujo un incremento en el nivel de fosforilación de ERK1, de la misma magnitud que el que consigue el IGF-I. La administración conjunta de IGF-I y letrozol, indujo un nivel de activación de ERK1 similar al que consiguieron cada uno de los tratamientos por separado. **B)** El nivel de fosforilación de ERK2 que indujo el letrozol, es similar al que se obtuvo tras el tratamiento con IGF-I y al que se detectó tras un tratamiento conjunto de las dos moléculas. **C)** El nivel de fosforilación de ERK1 que tras la inhibición de la aromatasa induce el IGF-I, no se vio modificado por la administración conjunta de IGF-I y estradiol exógeno, independientemente de que el tratamiento con este último durara 20 minutos o 28 horas. **D)** Tras la inhibición de la aromatasa, el cotratamiento con estradiol exógeno e IGF-I no cambió la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de ERK2, independientemente de la duración del tratamiento con estradiol. **E)** El IGF-I, fue capaz de anular el bloqueo que el estradiol exógeno administrado durante 28 horas ejerce sobre la capacidad del letrozol de incrementar el nivel de fosforilación de ERK1. **F)** En el nivel de fosforilación de ERK2 se observó lo mismo que en ERK1. C: neuronas tratadas con vehículo; Let: neuronas tratadas 28 horas con letrozol; IGF-I: neuronas tratadas 20 minutos con IGF-I; E2(20'): neuronas tratadas 20 minutos con 17 β -estradiol; E2(28h): neuronas tratadas 28 horas con 17 β -estradiol. En las figuras C-F, la línea roja indica el nivel del control. * $P < 0,05$ vs control; ^ $P < 0,05$ vs Let; ‡ $P < 0,05$ vs Let + E2(28h) + IGF-I (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

RESULTADOS

La inducción en los niveles de fosforilación de ERK1 y de ERK2 que vimos que generaba el bloqueo de la aromatasa (Fig 53), resultó ser de la misma magnitud que la generada por la administración de IGF-I (Fig 71 A y B). Sin embargo ambos tratamientos, letrozol e IGF-I, no mostraron tener efecto sinérgico, ya que la administración conjunta de las dos moléculas, no superó la respuesta que cada una consigue por separado (Fig 71 A y B). Tras la inhibición de la aromatasa, el tratamiento durante 20 minutos o 28 horas con estradiol exógeno no modificó la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de las dos proteínas de la vía (Fig 71 C y D). Por otra parte, como se ve en la figura 40, el tratamiento de 28 horas con estradiol exógeno fue capaz de bloquear la capacidad del letrozol de incrementar el nivel de fosforilación de las dos isoformas de ERK. Sin embargo al tratar de conseguir el mismo bloqueo de la activación de la vía de las MAPKs en presencia de IGF-I, la administración durante 28h de estradiol exógeno resultó insuficiente (Fig 71 E y F).

Finalmente, el tratamiento de 28 horas con ICI182780, bloqueó la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de ERK1, mientras que el tratamiento durante 50 minutos no tuvo efecto alguno (Fig 72 A). En el caso de ERK2, ninguno de los tratamientos con el inhibidor, independientemente de su duración, fue capaz de bloquear la capacidad del IGF-I de incrementar su nivel de fosforilación (Fig 72 B).

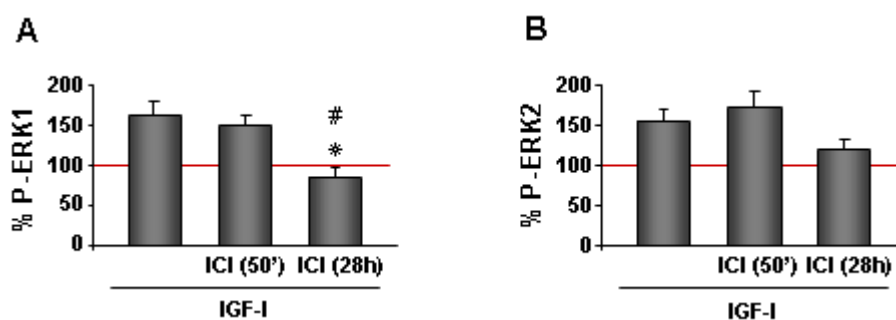


Figura 72. Efecto sobre la vía de las MAPKs del tratamiento con IGF-I, bajo la inhibición de los receptores de estrógeno en neuronas de corteza. A) El nivel de fosforilación de ERK1 que indujo el tratamiento con IGF-I, fue reducido significativamente por el tratamiento de 28 horas con ICI182780. El tratamiento de 50 minutos, por el contrario, no bloqueó el efecto del IGF-I. **B)** El tratamiento con ICI182780, independientemente de su duración, 50 minutos o 28 horas, no modificó la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de ERK2. C: neuronas tratadas con vehículo; ICI (50'): neuronas tratadas 50 minutos con ICI182780; ICI (28h): neuronas tratadas 28 horas con ICI182780. La línea roja indica el nivel del control. * $P < 0,05$ vs IGF; # $P < 0,05$ vs ICI + IGF-I (ANOVA no paramétrica: Test de Dunn).

5.4 NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENO Y DE IGF-I.

Aunque ya habíamos observado la presencia en los cultivos de los tres receptores, las dos isoformas del de estrógeno y el de IGF-I, nos pareció interesante estudiar si los niveles de expresión de los mismos, se veían afectados por alguno de los tratamientos empleados en el estudio y nos ayudaban a clarificar el mecanismo por el que el estradiol endógeno regulaba la señalización de las vías de la PI3K y de las MAPKs.

La comparación del nivel de expresión de los receptores, se realizó sólo entre los grupos que representan las cinco situaciones principales del estudio. Así pues mediante Western blot se comparó el nivel de expresión de los receptores en los grupos tratados con vehículo, IGF-I y estradiol, letrozol e ICI182780 durante 28h. No hubo cambios significativos en el nivel de expresión de ninguno de los receptores en respuesta a los diferentes tratamientos, ni en astrocitos de corteza o de hipocampo, ni en neuronas de corteza (Fig 73). Sin embargo, sí se observaron tendencias que aunque no resultaron significativas al realizar un ANOVA no paramétrico, sí que lo son en una comparación directa con el control. En astrocitos de corteza, sólo el tratamiento con ICI182780 durante 28 horas tuvo efecto. Dicho tratamiento, incrementó el nivel de expresión del receptor de IGF-I. En los astrocitos de hipocampo, las dos isoformas de los receptores de estrógeno fueron reguladas por los tratamientos. En respuesta al tratamiento tanto de estradiol como de ICI182780 durante 28 horas disminuyó la expresión del ER α . Mientras que el tratamiento con IGF-I disminuyó significativamente los niveles de expresión del ER β . Finalmente, en neuronas de corteza, el tratamiento con ICI182780 durante 28 horas incrementó significativamente el nivel de expresión del ER α .

RESULTADOS

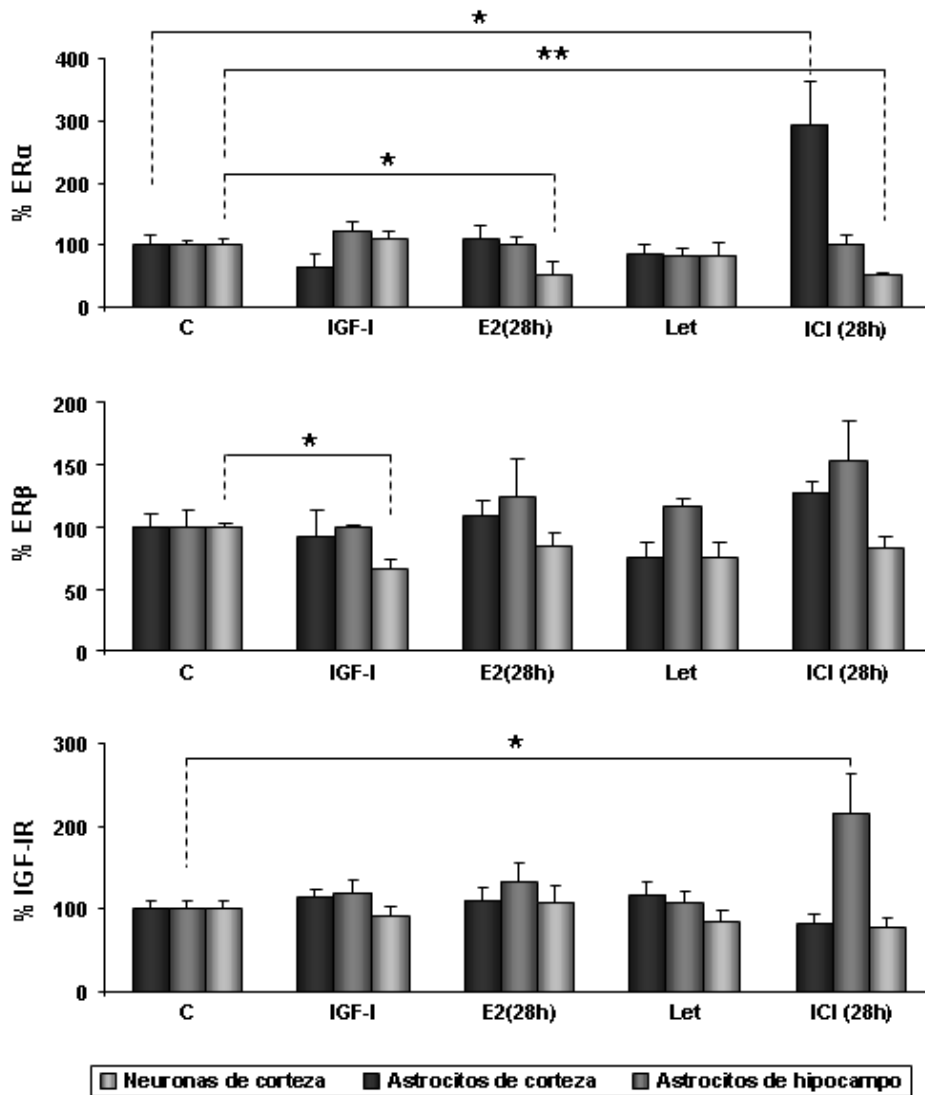


Figura 73. Efecto sobre la expresión de los receptores de estrógeno y de IGF-I de los principales tratamientos empleados en los cultivos primarios de astrocitos de corteza o hipocampo y de neuronas de corteza. A) El nivel de expresión del ER α no se vio modificado significativamente por ningún tratamiento en ninguno de los cultivos primarios en una comparación general. Sin embargo, en una comparación directa con el control, los tratamientos de 28 horas de estradiol y de ICI182780 sí que redujeron significativamente la expresión del receptor en astrocitos de hipocampo. Mientras que en neuronas de corteza, el tratamiento con ICI182780 durante 28 horas incrementó significativamente la expresión del receptor. **B)** El nivel de expresión del ER β no se vio modificado significativamente por ningún tratamiento en ninguno de los cultivos primarios en una comparación general. Pero en una comparación directa con el control, la reducción en el nivel de expresión del receptor que provoca el tratamiento con IGF-I en astrocitos de hipocampo, sí fue significativa. **B)** El nivel de expresión del receptor de IGF-I tampoco se vio modificado significativamente por ningún tratamiento en una comparación general. Sin embargo, en astrocitos de corteza, su nivel de expresión mostró un incremento significativo al compararse directamente, el control con el grupo tratado 28 horas con ICI182780. C: cultivo tratado con vehículo; IGF-I: cultivo tratado 20 minutos con IGF-I; E2(28h): cultivo tratado 28 horas con 17 β -estradiol; Let: cultivo tratado 28 horas con letrozol; ICI (28h): cultivo tratado 28 horas con ICI182780. * P<0,05 vs C; ** P<0,01 vs C (Test de Mann-Whitney).

DISCUSIÓN

1 EFECTO DE LA AUSENCIA DE HORMONAS GONADALES, DEBIDO A LA OVARECTOMÍA, SOBRE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA PI3K Y DE LAS MAPKS EN EL CEREBRO DE RATA HEMBRA

La ovariectomía forma parte del diseño experimental de gran parte de los estudios realizados *in vivo* para esclarecer el papel de los estrógenos en el cerebro. Al trabajar con hembras, se recurre a esta intervención quirúrgica a fin de eliminar el aporte hormonal de los ovarios y así poder controlar la dosis de estrógeno administrada al animal, que realmente está generando el efecto analizado.

Existen múltiples estudios que han demostrado que la carencia hormonal, fundamentalmente de estradiol, que experimenta el cerebro como consecuencia de la ovariectomía genera un gran número de alteraciones. Así pues, la ovariectomía induce la descompensación del equilibrio Bcl-2/Bax disminuyendo la expresión de la primera de las proteínas e incrementando la de la segunda, de tal manera que se produce una pérdida de viabilidad celular (Sharma K y Mehra RD, 2008). Con la pérdida de aporte hormonal, en roedores, la capacidad de respuesta tras un proceso de isquemia cerebral se ve mermada (Alkayed NJ y cols., 1998). Además, la ovariectomía reduce la expresión de moléculas que en el hipocampo están implicadas en plasticidad sináptica como son la sinaptofisina y la forma fosforilada de CREB (Sharma K y cols., 2007). Así mismo, la privación hormonal, interrumpe los procesos dinámicos de plasticidad sináptica en el hipocampo (Day M y Good M. 2005), siendo una de las causas de las deficiencias en memoria y aprendizaje que se han observado tras la ovariectomía (Monteiro SC y cols., 2005; Sato T y cols., 2003; Zhu JL y cols., 2004). Aunque esté repetidamente demostrado que el estradiol ayuda en la recuperación de los déficits que induce la ovariectomía, es importante tener en cuenta que dicha intervención, también elimina el aporte gonadal de progesterona. Así pues, los déficits observados tras la ovariectomía, también son consecuencia de esta pérdida de progesterona y pueden revertirse con su administración, aunque en algunos casos requiera la coadministración de estradiol (Cyr M y cols., 2000; Cyr M y cols., 2001; Singh M, 2001).

Tanto el estradiol, como la progesterona, son capaces de activar las vías de la PI3K-Akt (D'Astous M y cols., 2006; Ivanova T y cols., 2002; Quesada A y cols., 2008; Singh M, 2001; Guerra-Araiza C y cols., 2007, 2008) y de las MAPKs (Marin R y cols., 2005; Ivanova T y cols., 2001; Yi KD y cols., 2008; Guerra-Araiza C y cols., 2008). Además, se ha comprobado que dicha activación es necesaria para que las hormonas ováricas puedan ejercer su papel neuroprotector (Azcoitia I y cols., 2002; Bryant DN y

DISCUSIÓN

cols., 2006; Lee SJ y McEwen BS, 2001; Garcia-Segura LM y cols., 2001; Singh M, 2001; Morissette M y cols., 2008). Sin embargo, a pesar que es esperable que la ovariectomía tenga un efecto sobre el estado de activación de estas vías, se ha estudiado el efecto de la misma en el corazón (Wu CH y cols., 2005) y en el hueso (Tsai HY y cols., 2008; Katagiri M y cols., 2001), pero apenas en el cerebro. Sólo Szego y colaboradores, en el 2006, demostraron la disminución de CREB fosforilado como consecuencia de la ovariectomía, en el prosencéfalo basal. Debido a esta falta de información, nos planteamos estudiar el efecto que a corto plazo ejercía la privación hormonal, causada por la ovariectomía, sobre las vías de la PI3K y de las MAPKs en el cerebro.

El análisis de dos vías de señalización y los receptores que las regulan, en cuatro regiones cerebrales y en dos experimentos paralelos, genera un elevado volumen de datos que se aprecia más fácilmente en la tabla 10. En ésta, se muestran las cuatro regiones cerebrales analizadas y se indica con rojo un mayor nivel de expresión de los receptores o de fosforilación de las proteínas estudiadas, en el grupo con 30 días de ovariectomía con respecto al grupo con 10 días; con verde un menor nivel de expresión de los receptores o de fosforilación en esa misma comparación y con gris la ausencia de cambios significativos.

Tabla 10. Resumen de los cambios observados debido al paso del tiempo tras la ovariectomía en los niveles de fosforilación de Akt, GSK3 β , ERK1 y ERK2 y en los niveles de expresión de los receptores de IGF-I y de estrógeno en animales ovariectomizados con 2 meses de edad o sacrificados con 3 meses. En rojo se indica un mayor nivel de fosforilación o de expresión, en los animales con 30 días de OVX que en los de 10 días. En verde se indica un menor nivel, en los animales con 30 días de OVX y en gris, la ausencia de cambios significativos. Hc: hipocampo; Ht: hipotálamo; Cx: corteza prefrontal y Cb: cerebelo.

Factor constante Tiempo postOVX Área cerebral	Edad de OVX: 2 meses				Edad de sacrificio: 3 meses			
	10 días/ 30 días				10 días/ 30 días			
	Hc	Ht	Cx	Cb	Hc	Ht	Cx	Cb
P-Akt								
P-GSK3 β								
P-ERK 1								
P-ERK 2								
IGF-IR								
ER α / ER β								

	10d < 30d	10d = 30d	10d > 30d
--	-----------	-----------	-----------

Lo primero que se observó al contemplar la tabla, fue que el transcurso del tiempo en el proceso de adaptación a la ausencia de progesterona y de estradiol de origen gonadal, indujo cambios en los niveles basales de fosforilación de las proteínas estudiadas, que en el hipocampo, el hipotálamo y la corteza prefrontal, siempre implicaron un incremento en el nivel de fosforilación de las quinasas de las vías, mientras que en el cerebelo implicaron una disminución. Este patrón de respuesta al paso del tiempo tras la ovariectomía, dependiente de la región cerebral, se observó tanto en los animales que presentaban la misma edad de ovariectomía, como en los que presentaban la misma edad de sacrificio.

Por otro lado, independientemente de la región cerebral estudiada y de la edad a la que se realizó la operación, el mayor tiempo (30 días frente a 10 días) de adaptación a la ausencia de hormonas gonadales, indujo pocos cambios en los niveles de expresión de los receptores, que en caso de darse, siempre fueron de disminución.

Exceptuando el cerebelo, parece que se produce un incremento en el estado de activación de las vías de la PI3K y de las MAPKs, en respuesta a la pérdida de hormonas de origen gonadal. Este resultado está en desacuerdo con numerosas observaciones en las que se describe la capacidad que tienen el estrógeno y la progesterona de activar dichas vías. Sin embargo, como demostraron Zhao y colaboradores en 2005, los niveles circulantes de estradiol y la expresión de la aromatasa en hígado, en tejido adiposo abdominal y en corteza adrenal se ven gradualmente incrementados en ratas ovariectomizadas. En otros estudios más recientes, se ha mostrado que la ovariectomía incrementa la expresión de la aromatasa en la hipófisis de rata (Galmiche G y cols., 2006a, 2006b) y en muestras de cerebro completo (Ye L y Leung LK, 2008). Por lo tanto, teniendo en cuenta que, en respuesta a la ovariectomía, no sólo hay un incremento en la expresión, sino también en los niveles de actividad de la aromatasa (Ye L y Leung LK, 2008), es de esperar que el aumento en la expresión de la enzima, al incrementar los niveles de estradiol en el cerebro, active las vías de señalización, tal y como hemos observado en nuestro estudio.

En el caso de la progesterona, se desconoce el efecto que la ovariectomía tiene sobre su síntesis a nivel cerebral. Pero hay estudios que demuestran que el estradiol tiene la capacidad de inducirla tanto *in vitro* como *in vivo* (Sinchak K y cols., 2003; Micevych PE y cols., 2007; Micevych P y Sinchak K, 2008). Así pues, no es descartable que el estradiol generado por la aromatasa, induzca la síntesis de progesterona, que se sabe que tiene lugar en el cerebro (Jung-Testas I y cols., 1989;

DISCUSIÓN

Zwain IH y Yen SS, 1999; Charalampopoulos I y cols., 2008), de tal modo que esta última también contribuya a la activación de las vías de la PI3K y de las MAPKs.

En resumen, podría suponerse que la pérdida del aporte hormonal que cíclicamente liberan los ovarios al torrente sanguíneo, produce, en el cerebro, una disminución en el estado de activación de las vías de señalización estudiadas, que consiguen restablecerse cuando en un proceso de reequilibrio se incrementa la expresión de la aromatasa y se regulan internamente los niveles de estradiol y, en consecuencia, los de progesterona.

Del análisis de la tabla 10 también se infiere, que en estas condiciones no existe correlación entre el estado de fosforilación de Akt y de GSK3 β a pesar de la existencia de múltiples datos en la bibliografía, que demuestran dicha correlación (García-Segura LM y cols., 2006; Mendez P y García-Segura LM, 2006; Cardona-Gómez GP, 2002b). De hecho, la activación observada en Akt, al aumentar el tiempo transcurrido tras la ovariectomía, no conlleva la consecuente inactivación de GSK3 β . En este caso, Akt debe estar actuando sobre cualquiera de las otras múltiples dianas que tiene: proteínas antiapoptóticas de la familia de Bcl-2 (Pugazhenthí y cols., 2000; Assinder SJ y cols., 2009), proteínas proapoptóticas como Bad (Morissette M y cols., 2008; del Peso y cols., 1997) o factores de transcripción que controlan la supervivencia neuronal, como NF κ B (Chong ZZ y cols., 2005), CREB (Pugazhenthí y cols., 2000) y varios miembros de la familia Forkhead (Brunet A y cols., 1999; Kops GJ y cols., 1999; Tang ED y cols., 1999). De igual modo que se observaron cambios en los niveles de fosforilación de Akt, que no se correspondían con otros similares en GSK3 β , hubo cambios en los niveles de fosforilación de GSK3 β independientes de Akt. En este caso, es de suponer, que los niveles de fosforilación de GSK3 β están siendo controlados por la vía de señalización de Wnt o la de las MAPKs. Sobre esta última posibilidad se sabe que ERK, a través de la quinasa ribosomal S6 (RSK), también conocida como la proteína quinasa 1 activada por MAPK (MAPKAP-K1), es capaz de fosforilar e inhibir a GSK3 β (Sutherland C y cols., 1993; Saito Y y cols., 1994). Y si se vuelve a la tabla 10 se puede observar que en tres de las cuatro modificaciones que se observan en el estado de fosforilación de GSK3 β , hay una correlación entre el estado de activación de ERK1/2 y el de inactivación de GSK3 β .

En el caso de la vía de las MAPKs, aunque ERK1 y ERK2 no siempre muestran patrones similares de activación (Vantaggiato C y cols., 2006; Lefloch R y cols., 2008; Lloyd AC, 2006), en este estudio han respondido de igual manera en todas las regiones cerebrales, con la excepción del hipocampo. Así pues, en el hipocampo, los

niveles de fosforilación de ERK2 no experimentaron cambios debido al tiempo transcurrido tras la ovariectomía, mientras que los de ERK1 fueron mayores en los animales sacrificados a los 30 días de la operación que en los que el sacrificio se realizó a los 10 días.

Una vez analizados los efectos generales, nos centramos en comparar los resultados obtenidos en los dos grupos experimentales: el de los animales que presentan la misma edad de ovariectomía y el de los que presentan la misma edad de sacrificio. De este modo, quisimos ver si los cambios observados en el proceso de adaptación del cerebro a la ausencia de hormonas gonadales son consecuencia única del paso del tiempo tras la ovariectomía o si el momento en el que se realiza la castración afecta a la evolución de dicho proceso adaptativo.

Como se puede observar en la tabla 10, los cambios en los niveles de fosforilación de las quinasas estudiadas en el hipotálamo, fueron los mismos independientemente de la edad en la que los animales fueron ovariectomizados o sacrificados. Por lo tanto, podemos concluir que el hipotálamo es, de las cuatro regiones cerebrales, la única en la que la regulación del estado de activación de las vías de señalización estudiadas, se debe exclusivamente al paso del tiempo tras la ovariectomía.

En las otras regiones cerebrales, el hipocampo, la corteza prefrontal y el cerebelo, ésta regulación dependiente del tiempo transcurrido tras la ovariectomía, también se da, pero sólo en una de las dos vías: en el cerebelo es responsable de la disminución que se observa en los niveles de fosforilación de GSK3 β , mientras que en el hipocampo y la corteza prefrontal, lo es del aumento en la activación de la vía de las MAPKs. En contraposición, la activación de la vía de la PI3K indicada por el incremento en la fosforilación de Akt en el hipocampo y la corteza prefrontal y la inactivación de la vía de las MAPKs en el cerebelo, son consecuencia del paso del tiempo transcurrido tras la ovariectomía, pero también de la edad a la que tiene lugar dicha operación, ya que dichos cambios sólo se observaron en los animales sacrificados con tres meses de edad.

Estos resultados indican que la ovariectomía tiene efecto a nivel molecular en diferentes regiones del cerebro. Por lo que a la hora de diseñar el protocolo de un experimento que incluya la ovariectomía, tiene que tenerse en cuenta la importancia del tiempo que transcurra desde la operación hasta el comienzo del experimento en si mismo, ya que no sólo se está dejando reposar al animal para que se recupere de la operación. Hay que tener en cuenta que se ha alterado en muchos niveles la situación

DISCUSIÓN

normal del organismo por lo que no son estrictamente correctas comparaciones entre grupos en los que se modifique la edad de ovariectomía o el tiempo transcurrido tras la operación, ya que la situación basal desde la que se parte, puede ser significativamente distinta.

2 EFECTO DE LA MADUREZ SEXUAL EN LA CAPACIDAD DEL ESTRADIOL DE ACTIVAR LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE LA PI3K Y DE LAS MAPKS EN CORTEZA PREFRONTAL DE RATA

En múltiples estudios se ha mostrado que el tratamiento con estradiol incrementa los niveles de fosforilación de Akt en las células del cerebro, incluyendo neuronas corticales y del hipocampo, (Honda K y cols., 2000; Singh M, 2001; Cardona-Gómez GP y cols., 2002a; Ivanova T y cols., 2002; Wilson ME y cols., 2002; Cimarosti H y cols., 2005; D'Astous M y cols., 2006; Koh PO y cols., 2006; Mannella P y Brinton RD, 2006; Dominguez R y cols., 2007; Znamensky V y cols., 2003). Como ya se ha comentado, uno de los sustratos de Akt es GSK3 β , que puede ser fosforilada e inhibida por Akt en respuesta a estradiol en cerebro (Cardona-Gómez GP y cols., 2004; Cimarosti H y cols., 2005; Goodenough S y cols., 2005; D'Astous M y cols., 2006; Koh PO y cols., 2006). En estudios previos del laboratorio, se había mostrado que la fosforilación de Akt y GSK3 β por estradiol en el cerebro, requiere una elevada dosis de hormona (Cardona-Gómez GP y cols., 2002a, 2004), sugiriendo la implicación de un mecanismo de acción no clásico. De acuerdo con estos datos previos, nosotros hemos observado que la administración de una dosis alta de estradiol en ratas con dos meses de vida, que llevaban 10 días ovariectomizadas, generaba una fosforilación substancial de Akt y de GSK3 β en la corteza prefrontal, que era detectada hasta 24 horas después de la administración de la hormona. Sin embargo, el estradiol administrado en las ratas ovariectomizadas con un mes de vida y tratadas a los 2 meses, no indujo un incremento significativo de los niveles de fosforilación de Akt ni de GSK3 β , en la corteza prefrontal. Por lo tanto, nuestros resultados indican que el estradiol induce la fosforilación de Akt y de GSK3 β en la corteza prefrontal de animales que han sido ovariectomizados después de la pubertad, mientras que no afecta a los niveles de fosforilación de Akt ni de GSK3 β en la corteza prefrontal, de animales que fueron ovariectomizados antes de la pubertad. Nuestros resultados no excluyen que el estradiol pueda modificar la fosforilación de Akt y de GSK3 β en la corteza prefrontal a tiempos cortos. Sin embargo, sugieren que una

administración aguda de estradiol no es capaz de generar una activación de Akt y una inactivación de GSK3 β en la corteza prefrontal de ratas prepuberales, que se mantenga 24 horas después de la administración hormonal. Este resultado indica, que la sensibilidad de la señalización del receptor de IGF-I en la corteza prefrontal a las acciones reguladoras del estradiol se ve modificada durante la pubertad.

El diferente efecto del estradiol sobre la fosforilación de Akt y de GSK3 β observado en los dos experimentos podría ser debido al tiempo transcurrido tras la ovariectomía. Por ello se estudió si en ratas ovariectomizadas con un mes, la inyección de estradiol 10 días después de la operación tenía efecto sobre la vía de la PI3K en la corteza prefrontal, 24 horas después de la administración de la hormona. Los resultados del experimento mostraron que, bajo estas condiciones, el estradiol también es incapaz de modificar la fosforilación de Akt y de GSK3 β . Por tanto, el tiempo transcurrido tras la ovariectomía no parece ser un factor crítico que explique la diferente respuesta obtenida en los dos primeros experimentos. Así mismo, no podemos excluir completamente, que la diferente respuesta observada entre el primer experimento y este último, se deba en parte a la edad a la que tiene lugar el tratamiento. Sin embargo, nuestros resultados sí que indican que la edad de ovariectomía es uno de los factores que afectan a la respuesta del tejido cortical al estradiol, ya que la hormona incrementa la fosforilación de Akt y de GSK3 β en animales ovariectomizados después de la pubertad, pero no tiene efecto en animales ovariectomizados antes de la pubertad, independientemente de que la hormona se inyecte antes o después de la pubertad. Por lo tanto, los datos obtenidos sugieren que durante la pubertad hay una programación de la futura regulación del estradiol sobre la señalización del receptor de IGF-I en la corteza prefrontal y que esta programación parece depender de las hormonas ováricas, ya que desaparece con la ovariectomía prepuberal.

El efecto del estradiol en la fosforilación de Akt y de GSK3 β en el cerebro parece depender de la interacción del ER α con la fosfatidilinositol 3-kinasa y un complejo macromolecular que incluye al receptor de IGF-I, a Akt y a GSK3 β además de otros componentes de la señalización del receptor de IGF-I (Mendez P y cols., 2003, 2006; Mannella P y Brinton RD, 2006). Por tanto, el efecto del estradiol en la fosforilación de Akt y de GSK3 β podría justificarse por cambios en la expresión del ER α , IGF-IR, Akt o GSK3 β . Sin embargo, los niveles basales de expresión de Akt, GSK3 β , ER α e IGF-IR en la corteza prefrontal no se ven afectados por la edad a la

DISCUSIÓN

que los animales fueron ovariectomizados o sacrificados, como indicó la ausencia de diferencias entre los animales de los tres experimentos. Además, la administración de estradiol no afectó a los niveles de proteína del ER α y el IGF-IR, como era de esperar, en base a estudios previos que indicaban que la regulación del ER α y el IGF-IR por estradiol, requiere un tratamiento crónico (Weiland NG y cols., 1997; Cardona-Gómez GP y cols., 2000a, 2001; El-Bakri NK y cols., 2004; Iivonen S y cols., 2006). Por lo tanto, los cambios en los niveles basales o en respuesta al tratamiento con estradiol de estas moléculas no son la explicación de que el estradiol no sea capaz de fosforilar Akt y GSK3 β en animales ovariectomizados antes de la pubertad. Otro factor que podría estar afectando potencialmente a la interacción del ER α con el IGF-IR y por lo tanto a la respuesta de la señalización del IGF-I y el estradiol es la modificación en la localización subcelular o tisular de sus receptores. Sin embargo, esta no parece ser la causa en nuestro estudio, ya que no fuimos capaces de detectar diferencias en el patrón de inmunorreactividad del ER α y del IGF-IR en la corteza prefrontal de los animales pre y postpuberales. La inmunorreactividad para el ER α fue detectada en núcleos celulares grandes, que probablemente correspondan a neuronas (Cardona-Gómez GP y cols., 2000b), en toda la región cortical tanto en animales prepúberales como postpuberales. El número de núcleos celulares inmunorreactivos para el ER α fue similar en los animales pre y postpuberales y no se encontraron diferencias significativas en la intensidad del marcaje. Como se había observado en estudios previos (Cardona-Gómez GP y cols., 2000b), la inmunorreactividad para el receptor de IGF-I fue detectada en torno al núcleo y en la dendrita apical de las neuronas piramidales. El patrón subcelular del marcaje y el número de células inmunorreactivas para el receptor de IGF-I fue similar en los animales pre y postpuberales. Estos resultados sugieren que debe de existir otra molécula involucrada en la regulación que el estradiol ejerce sobre la señalización de membrana o citoplasmática, que debe verse afectada por la pubertad. Entre las posibles moléculas, un potencial candidato es el IGF-I, que interacciona sinérgicamente con el estradiol en la activación de Akt en la corteza cerebral y en otras regiones del cerebro (Cardona-Gómez GP y cols., 2002a). Los niveles del IGF-I se ven incrementados en el plasma de rata durante la llegada a la pubertad (Handelsman DJ y cols., 1987; Hiney JK y cols., 1996) mientras que su síntesis local y los niveles de inmunorreactividad en la corteza cerebral de rata disminuyen antes de la pubertad (Bach MA y cols., 1991; García-Segura LM y cols., 1991). Por lo tanto, es concebible que las diferentes respuestas de la señalización del IGF-IR frente al estradiol, tengan su origen en diferentes niveles locales del IGF-I en la corteza prefrontal en ratas prepúberales y postpuberales, o a un balance distinto entre

el IGF-I central y el periférico. Teniendo en cuenta que la fosforilación de Akt y GSK3 β ha sido cuantificada 24 horas después de la administración del estradiol, no se puede descartar la implicación de un mecanismo transcripcional en la regulación hormonal de la fosforilación de estas quinasas. Las modificaciones en los niveles del IGF-I durante la pubertad podrían afectar a las acciones transcripcionales del estradiol en la corteza prefrontal, ya que el IGF-I regula la actividad transcripcional del ER en las neuronas (Ma ZQ y cols., 1994; Patrone C y cols., 1998; Mendez P y Garcia-Segura LM, 2006). Además, los cambios en la expresión de cofactores transcripcionales del ER podrían ser responsables de la diferente respuesta de la señalización del receptor de IGF-I al tratamiento con estradiol antes y después de la pubertad.

La relevancia fisiológica del diferente efecto de los niveles altos de estradiol en la fosforilación de Akt y de GSK3 β en la corteza prefrontal de ratas pre y postpuberales es desconocida. Sin embargo, se sabe que la activación de Akt por estradiol media los efectos hormonales en plasticidad sináptica (Znamensky V y cols., 2003) y en supervivencia neuronal (Honda K y cols., 2000; Zhang L y cols., 2001; Yu X y cols., 2004). También se sabe que el estradiol incrementa los niveles de Bcl-2 y de otros miembros antiapoptóticos de la familia de Bcl-2 en las neuronas del cerebro (Garcia-Segura LM y cols., 1998; Dubal DB y cols., 1999; Nilsen J y Brinton RD, 2003; Zhao L y cols., 2004; Yao M y cols., 2007) y que Akt puede estar involucrada en estos efectos hormonales (D'Astous M y cols., 2006). La quinasa Akt también puede regular la supervivencia neuronal, el crecimiento neurítico y la plasticidad neuronal a través de la fosforilación inhibitoria de GSK3 β . Esta quinasa regula la fosforilación de proteínas asociadas a microtúbulos y por lo tanto, la dinámica de los mismos, el crecimiento y la retracción de las prolongaciones neuríticas y la formación de sinapsis y la plasticidad (Jones DM y cols., 2003; Zhou FQ y cols., 2004; Arevalo JC y Chao MV, 2005; Garrido JJ y cols., 2007; Peineau S y cols., 2007). Además, la fosforilación e inhibición de GSK3 β está asociada con el aumento de la supervivencia neuronal (Cross DA y cols., 1995) y con la promoción de la supervivencia neuronal por estradiol (Goodenough S y cols., 2005; D'Astous M y cols., 2006). Así pues, la modificación en la regulación de Akt y GSK3 β en respuesta al estradiol durante la pubertad, puede estar relacionada con las modificaciones en la supervivencia neuronal, el crecimiento neurítico y la plasticidad sináptica que ocurren en la corteza prefrontal durante la transición del adolescente al adulto.

DISCUSIÓN

3 EFECTO DE LA EDAD, LA OVARIECTOMÍA Y EL TRATAMIENTO CON ESTRADIOL EN LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES DE IGF-I Y DE ESTRÓGENO EN CEREBRO DE RATA

Son múltiples las funciones que el estradiol y el IGF-I desempeñan de forma coordinada en el cerebro, incluyendo la regulación de procesos neuroendocrinos, la plasticidad sináptica y la respuesta neuronal a una lesión (Naftolin F y cols., 2007; Garcia-Segura LM y cols., 2001; Mendez P y cols., 2005; Garcia-Segura LM y cols., 2007). Estas acciones son desarrolladas a través de sus respectivos receptores que no sólo se expresan a lo largo de todo el sistema nervioso sino que también colocan, tanto en neuronas, como en astrocitos (Cardona-Gómez GP y cols., 2000b). Existen varios estudios en los que se analiza el efecto de la ovariectomía, del tratamiento con estradiol o de la edad, sobre la expresión de dichos receptores en el cerebro (Mohamed MK y Abdel-Rahman AA, 2000; Rubin BS y cols., 1986; Yamaguchi-Shima N y Yuri K, 2007; Chakraborty TR y cols., 2003; El-Bakri NK y cols., 2004; Bondy CA y Lee WH, 1993). Sin embargo, además de ser escasos los datos sobre cantidad de proteína, ya que en su mayoría analizan el nivel de mRNA o el número de células inmunorreactivas, ninguno de los estudios analiza los posibles cambios en la expresión de estos receptores en el cerebro de animales viejos sometidos a un largo periodo de privación hormonal. Por ello, decidimos estudiar el efecto de una prolongada ovariectomía, del tratamiento con estradiol y de la edad, sobre la cantidad de proteína de los receptores de IGF-I y de estrógeno presente en el cerebro de ratas hembra.

En nuestro modelo, la privación prolongada de hormonas gonadales como consecuencia de la ovariectomía, incrementó el nivel de expresión del ER α en el cerebelo, mientras que no tuvo consecuencias en el hipocampo, el hipotálamo y la corteza prefrontal. En contraposición, Mohamed y Abdel-Rahman, en el 2000, observaron que una ovariectomía de más de 4 meses incrementaba los niveles del ER α en la corteza, si bien no generaba cambios significativos en el cerebelo. Una posible explicación al diferente efecto de la ovariectomía observado en los dos estudios podría ser la edad de los animales. Mientras que en el estudio de Mohamed y Abdel-Rahman, las ratas eran de mediana edad, en el nuestro eran viejas y se ha comprobado que la respuesta a la ovariectomía muestra diferente magnitud en roedores, dependiendo de la edad (Chakraborty TR y Gore AC, 2004).

Tanto en las ratas con una postovariectomía larga, como en las ratas con una postovariectomía corta, el tratamiento agudo con estradiol no fue capaz de modificar el

nivel de expresión del ER α en ninguna de las cuatro regiones cerebrales estudiadas. Vuelve a confirmarse, también en el cerebro de animales viejos, sometidos a un corto o largo periodo de privación hormonal, que la administración aguda de estradiol no tiene efecto sobre el nivel de expresión del ER α (Chakraborty TR y Gore AC, 2004; livonen S y cols., 2006; Vida B y cols., 2008).

Finalmente, al comparar el nivel de proteína del ER α presente en animales jóvenes (3 meses) y animales viejos (18 meses), no observamos diferencias en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas. Así pues, el envejecimiento no sólo no modifica el nivel de expresión del ER α en el hipotálamo y la corteza prefrontal, como ya se sabía (Wise PM y Camp P, 1984; Madeira MD y cols., 2000; Thakur MK y Sharma PK, 2007; Funabashi T y cols., 2000), sino que tampoco en el hipocampo y el cerebelo. Nuevamente existe una discrepancia con los estudios que muestran una disminución en la expresión del receptor en el hipotálamo (Brown TJ y cols., 1990; Rubin BS y cols., 1986) y en el hipocampo (Mehra RD y cols., 2005) como consecuencia de la edad. Una posible explicación de esta discrepancia de resultados, está en la técnica empleada para determinar los cambios en el ER α . Hay trabajos basados en la detección por hibridación *in situ*, del nivel de mRNA del ER α (Funabashi T y cols., 2000), mientras que en otros se emplea la técnica de la RT-PCR (Mohamed MK y Abdel-Rahman AA, 2000; livonen S y cols., 2006; Thakur MK y Sharma PK, 2007). Los métodos inmunológicos, como el recuento estereológico de neuronas inmunorreactivas para el ER α (Mehra RD y cols., 2005; Vida B y cols., 2008; Madeira MD y cols., 2000) o el Western blotting para valorar la cantidad de proteína del ER α (Mehra RD y cols., 2005), han sido otras de las aproximaciones experimentales. En cualquier caso, el nivel de proteína no tiene porqué guardar relación con el nivel de mRNA, ya que dependen de la regulación transcripcional o postranscripcional que presente el ER α .

La expresión del ER β en el cerebro ha sido menos estudiada que la del ER α , por lo que tenemos muchos menos datos de partida. En nuestro modelo, no observamos cambios en el nivel de proteína del ER β en ninguna de las cuatro regiones cerebrales al comparar ratas viejas con 1 mes de postovariectomía, con ratas viejas con 16 meses de postovariectomía. Por su parte, el tratamiento agudo con estradiol, cuando fue aplicado a animales viejos con un largo periodo de privación hormonal, redujo el nivel del ER β en el hipotálamo y el cerebelo, mientras que en el hipocampo lo incrementó. Los datos del cerebelo y del hipotálamo coinciden con estudios anteriores (Shima N y cols., 2003; Vida B y cols., 2008). Sin embargo, el

DISCUSIÓN

incremento observado en el hipocampo, muestra discrepancias con estudios anteriores que indican que el tratamiento agudo con estradiol no modifica el nivel del ER β , ya que sólo el tratamiento crónico consigue hacerlo (Iivonen S y cols., 2006). La capacidad del estradiol de regular el nivel del ER β , parece depender tanto del protocolo de administración del estradiol, como del tiempo de privación hormonal. De hecho, cuando administramos estradiol a ratas viejas con sólo un mes de ovariectomía, no se generaron cambios en el nivel de expresión del ER β .

Se ha comprobado recientemente, que el envejecimiento disminuye el nivel del ER β en el hipocampo, el hipotálamo, la corteza y el cerebelo (Mehra RD y cols., 2005; Wilson ME y cols., 2002; Yamaguchi-Shima N y Yuri K, 2007; Chakraborty TR y cols., 2003). Sin embargo, debido al envejecimiento, nosotros sólo detectamos una disminución en el nivel de proteína del ER β , en el hipotálamo. Hay que tener en cuenta que el nivel de estradiol en sangre en las ratas viejas, se mantiene alto durante mucho más tiempo después de la ovariectomía que en las ratas jóvenes (Chakraborty TR y Gore AC, 2004). Es por lo tanto posible que el transcurso de un mes tras la ovariectomía en los animales viejos no haya sido suficiente para la eliminación total del estradiol en sangre, de modo que al comparar el nivel del ER β detectado entre los animales de 3 meses y los de 18 meses, se esté viendo el efecto no sólo del envejecimiento de los animales, sino también de su diferente adaptación a la ovariectomía. La disminución observada en el hipotálamo puede ser debida en parte a los mayores niveles de estradiol presentes en el animal viejo, que como acabamos de ver inducen una disminución en los niveles de expresión de ER β en esta región cerebral.

Existe abundante información sobre el efecto de la ovariectomía y del tratamiento con estradiol sobre el nivel de expresión del receptor de IGF-I en el cerebro. En términos generales, el aumento en el nivel de IGF-I en plasma, provoca una disminución del nivel de receptor de IGF-I y viceversa. En consonancia con esta hipótesis, nuestros resultados muestran que, como respuesta a una larga ovariectomía, que produce un aumento en el IGF-I plasmático (El-Bakri NK y cols., 2004), se produce una reducción en el nivel de proteína del receptor de IGF-I en el hipocampo, el hipotálamo y el cerebelo de rata. Estos resultados, concuerdan con las observaciones de El-Bakri y sus colaboradores en el 2004, que mediante la autorradiografía del receptor de IGF-I, empleando IGF-I marcado con I¹²⁵ como ligando, demostraron que la ovariectomía reducía densidad del receptor de IGF-I en cerebro de ratas adultas.

Coincidiendo con estudios anteriores (Cardona-Gómez GP y cols., 2000a, 2001), el tratamiento agudo con estradiol no modificó la expresión del receptor de IGF-I en ninguna de las regiones cerebrales estudiadas. Teniendo en cuenta que la ovariectomía incrementa el nivel de IGF-I en plasma y que el estradiol no modifica el nivel del receptor de IGF-I, se puede suponer, que el efecto que la ovariectomía tiene sobre el nivel de expresión del receptor de IGF-I, es debido, al menos en parte, al aumento de IGF-I en plasma que ocasiona la ovariectomía.

Asociada al envejecimiento, se observa una reducción del IGF-I en plasma (Puglielli L, 2008; Bondy CA y Lee WH, 1993) que parece tener consecuencias en el cerebro. Así pues, hay estudios en los que mediante la administración de IGF-I se consiguen paliar déficits relacionados con el envejecimiento, como son, la pérdida de capacidades cognitivas o la disminución de la neurogénesis en hipocampo (Lichtenwalner RJ, 2001; Trejo JL y cols., 2004; Aleman A y cols., 1999; Darnaudéry M y cols., 2006). En nuestro modelo, el envejecimiento incrementó el nivel de expresión del receptor de IGF-I en el hipocampo y el hipotálamo (Puglielli L, 2008; Chung YH y cols., 2002). Dicho efecto podría ser la respuesta a la pérdida de ligando que produce la edad. En el cerebelo, sin embargo, los niveles del receptor de IGF-I no siguen la pauta esperada, ya que el envejecimiento, que reduce los niveles de IGF-I en sangre, también redujo el nivel de proteína del receptor. Esta respuesta contraria en el cerebelo, podría deberse a la existencia de diferencias en cuanto al nivel de IGF-I entre las regiones del cerebro, ya que la capacidad del IGF-I de atravesar la barrera hematoencefálica se ve afectada por la edad (Carro E y Torres-Aleman I, 2004).

Hemos visto que la edad, la ovariectomía o el tratamiento hormonal regulan la expresión de los receptores de estrógeno y de IGF-I, de manera dependiente de tejido. Así pues, los cambios en la expresión relativa de los receptores de estrógeno y de IGF-I pueden tener consecuencias funcionales en cerebro, ya que dependiendo de la región cerebral, el receptor de IGF-I podría interactuar con la isoforma α o β del receptor de estrógeno, generando una respuesta diferente a la administración tanto de IGF-I como de estradiol. Los receptores de estrógeno y de IGF-I colocalizan en diferentes poblaciones de neuronas y de astrocitos a lo largo de todo el sistema nervioso central de ratas (Cardona-Gómez GP y cols., 2000b; Garcia-Segura LM y cols., 2000) y dicha colocalización concuerda con los numerosos trabajos que describen la capacidad que tiene cada hormona de regular la función de la otra. En neuronas, el IGF-I regula la actividad transcripcional del ER α de manera específica según haya o no estradiol en el medio. Mientras que en ausencia de estradiol, el IGF-I incrementa la actividad transcripcional del ER α en varios neuroblastomas (Ma ZQ y

DISCUSIÓN

cols., 1994; Patrone C y cols., 1998), en presencia de estradiol, reduce la actividad transcripcional del ER α , a través de la vía de la PI3K (Mendez P y Garcia-Segura LM, 2006). Dicha actividad transcripcional regula la expresión de neurotrofinas como el factor de crecimiento derivado del cerebro (BDNF) y su receptor de alta afinidad, TrkB (Miranda RC y cols., 1994; Sohrabji F y cols., 1995), y de genes antiapoptóticos como Bcl-2 (Sharma K y Mehra RD, 2008; Zhao L y cols., 2004) o implicados en neuroprotección (Maggi A y cols., 2004) o desarrollo neuronal (Ciana P y cols., 2003).

Por su parte, el estradiol también es capaz de regular la señalización del receptor de IGF-I en el cerebro, activando tanto *in vivo*, como *in vitro*, las dos principales cascadas de señalización del receptor de IGF-I.

- La vía de la PI3K (Cardona-Gómez GP y cols., 2001, 2002b; Ivanova T y cols., 2002; Wilson ME y cols., 2002; Znamensky V y cols., 2003), relacionada con procesos de plasticidad sináptica (Znamensky V y cols., 2003) y de neuroprotección (Garcia-Segura LM y cols., 1996; Honda K y cols., 2000; Yu X y cols., 2004; Zhang L y cols., 2001).

- La vía de las MAPKs (Bi R y cols., 2001; Cardona-Gómez GP y cols., 2001, 2002a, 2002b). Esta vía, al igual que la de la PI3K, también está implicada en procesos de neuroprotección (Garcia-Segura LM y cols., 1996; Guerra B y cols., 2004; Kuroki Y y cols., 2001; Singer CA y cols., 1999) y de plasticidad sináptica (Bi R y cols., 2001). Además se ha comprobado su papel como inductora de la arborización neurítica (Dominguez R y cols., 2004).

Además, el IGF-I y el estradiol actuando de forma conjunta, tienen efecto sinérgico en la activación de Akt, aunque no en la de ERK1/2 (Cardona-Gómez GP y cols., 2002b).

4. EFECTO DE LA ACTIVIDAD AROMATASA Y DEL ESTRADIOL EXÓGENO SOBRE LAS VÍAS DE LA PI3K Y DE LAS MAPKS EN ASTROCITOS O NEURONAS

La enzima aromatasa, que cataliza la conversión de testosterona en estradiol, se expresa en todo el sistema nervioso central de vertebrados (Naftolin F y cols., 1971a, 1971b, 1972, 1975; Flores F y cols., 1973). Aunque *in vivo* y en condiciones fisiológicas sólo se ha observado su expresión en neuronas (Balthazart J y Ball GF, 1998; Hojo Y y cols., 2004; Yague JG y cols., 2006; Lephart ED, 1996), en cultivos primarios y en condiciones de neurodegeneración *in vivo*, también se ha detectado en

astrocitos (Zwain IH y Yen SS, 1999; Zwain IH y cols., 1997; Liu M y cols., 2007; Azcoitia I y cols., 2003; Carswell HV y cols., 2005; Garcia-Segura LM y cols., 1999). Se sabe que el estradiol regula en el cerebro, la actividad sináptica (Garcia-Segura LM y McCarthy MM, 2004), la plasticidad sináptica (Cooke BM y Woolley CS, 2005; McEwen BS, 2001), la neurogénesis (Tanapat P y cols., 2005; Galea LA y cols., 2006) y la respuesta de tejido neural a un daño (Wise PM y cols., 2000; Suzuki S y cols., 2006; Morissette M y cols., 2008). El estradiol puede llevar a cabo las funciones señaladas anteriormente, gracias a su capacidad de regular las vías de señalización de la PI3K y de las MAPKs (Garcia-Segura LM y cols., 2006; Mendez P y Garcia-Segura LM, 2006; Mendez P y cols., 2006). La aromatasa cerebral, como enzima responsable de la síntesis de estradiol, también está involucrada en la regulación de estos procesos (Garcia-Segura LM, 2008; Balthazart J y cols., 2006a, 2006b; Martinez-Cerdeño V y cols., 2006; Fester L y cols., 2006; Sierra A y cols., 2003; McCulloch LD y cols., 2003; Azcoitia I y cols., 2001, 2005). Sin embargo, hay poca información sobre los mecanismos celulares que median estas funciones de la enzima. Nuestros datos muestran que la aromatasa endógena, expresada en neuronas y astrocitos de corteza cerebral, regula la actividad de las vías de señalización de la PI3K y de las MAPKs, mientras que la expresada en astrocitos de hipocampo no la regula.

Para el estudio del efecto del estradiol *in vitro*, hemos empleado cultivos primarios de astrocitos de corteza cerebral o de hipocampo de ratas postnatales, que fueron tratados con 100nM de 17 β -estradiol, a tiempos cortos (20min) y largos (28h). Sin embargo, a pesar de lo observado por otros grupos (Zhang L y cols., 2001; Dhandapani KM y cols., 2005), ninguno de los tiempos de tratamiento modificó el grado de activación de las vías de la PI3K, ni de las MAPKs, independientemente de la región de procedencia de los astrocitos. Ya en el 2002 Ivanova y colaboradores, demostraron que el estradiol no era capaz de activar Akt, en astrocitos del tegmento mesencefálico aunque sí lo hacía en neuronas. Sin embargo, en el caso de la vía de las MAPKs observaron el efecto contrario, ya que el estradiol incrementaba la fosforilación de ERK1/2 en astrocitos, pero no en neuronas. Tampoco hubo cambios en los niveles de fosforilación de Akt, de GSK3 β ni de ERK1/2 tras administrar, durante 28h, letrozol, un inhibidor selectivo de la aromatasa (Dowsett M y cols., 1995). Sin embargo, el tratamiento con letrozol permitió que la incubación con estradiol durante 28h activara la fosforilación de Akt, de GSK3 β y de ERK1/2, en los astrocitos de corteza cerebral. En los astrocitos de hipocampo, el bloqueo de la aromatasa mediante letrozol, no capacitó al estradiol exógeno para regular el estado de activación de las vías de señalización de la PI3K, ni de las MAPKs. Parece que en astrocitos, la

DISCUSIÓN

respuesta de las vías de señalización de la PI3K y de las MAPKs a una administración de estradiol exógeno, es regulada por la actividad de la aromatasa endógena, sólo en algunas regiones cerebrales. Se observaron resultados similares al analizar la influencia sobre la neurogénesis del estradiol sintetizado por neuronas de hipocampo en cultivo (Fester L y cols., 2006). En este estudio observaron que la administración de letrozol reducía el número de células proliferativas mientras incrementaba el de las apoptóticas. Por otra parte, la administración de estradiol no tenía efecto, per se, sobre la proliferación o la apoptosis, aunque sí era capaz de contrarrestar el efecto del letrozol sobre el crecimiento del cultivo.

Además, como era de esperar en base a estudios previos que indicaban que la activación de las vías de la PI3K y de las MAPKs por estradiol, es dependiente de sus receptores (Dhandapani KM y cols., 2005), la administración de ICI182780, el antagonista de los receptores de estrógeno, bloqueó la capacidad de incrementar los niveles de fosforilación de Akt, de GSK3 β y de ERK1/2 que tiene el estradiol exógeno, en presencia de letrozol. Así pues, la activación de las vías de la PI3K y de las MAPKs inducida por la administración de estradiol tras la inhibición de la aromatasa en astrocitos de corteza cerebral, es dependiente de los receptores de estrógeno.

En cultivos primarios de neuronas de corteza cerebral de ratas embrionarias, la administración de estradiol, tampoco modificó los niveles de fosforilación de Akt, de GSK3 β ni de ERK1/2, independientemente de la duración del tratamiento. Sin embargo, aunque la administración de letrozol no tuvo efecto sobre la vía de la PI3K, sí que incrementó los niveles de fosforilación de ERK1 y de ERK2, sugiriendo que, en las neuronas de corteza cerebral, el estradiol endógeno inhibe la activación de esta vía. Apoyando esta hipótesis, observamos que, en presencia de letrozol, la incubación con estradiol durante 28h reducía los niveles de fosforilación de ERK1 y de ERK2, a los observados en la situación control. Por otra parte, el restablecimiento de los niveles basales de fosforilación de ambas proteínas, sólo se consiguió con el tratamiento largo de estradiol. Así pues, teniendo en cuenta los trabajos en los que se relacionan las respuestas celulares lentas debidas al estradiol, con mecanismos de activación génica (Balthazart J y cols., 2003; Vasudevan N y cols., 2005), podría suponerse que el efecto inhibitorio del estradiol sobre la vía de las MAPKs implica una regulación transcripcional. Pero, el tratamiento con ICI182780, que bloquea las dos isoformas del receptor de estrógeno, no modificó significativamente el estado de activación de la vía de las MAPKs. Sin embargo, a pesar de la ausencia de significación estadística, existe un patrón idéntico en el nivel de fosforilación de ERK1 y de ERK2, en base al cual se

podría hablar de una tendencia a la baja, en respuesta al tratamiento durante 28 horas con ICI182780. Por tanto, no se puede concluir que el efecto inhibitorio que el estradiol ejerce sobre la vía de las MAPKs, sea independiente de los receptores de estrógeno.

En conclusión, nuestros resultados indican que, en astrocitos y neuronas de corteza cerebral, la actividad de la aromatasa endógena regula, de forma específica según el tipo celular, la fosforilación de las quinasas de las vías de la PI3K y de las MAPKs y afecta a la respuesta que estas quinasas tienen a una administración exógena de estradiol. Estos datos indican que las vías de la PI3K y de las MAPKs están involucradas en las acciones celulares de la aromatasa cerebral y sugieren que la respuesta del sistema nervioso a la terapia estrogénica, puede verse afectada por la síntesis local de estradiol. Si tenemos en cuenta que *in vivo* la aromatasa es expresada constitutivamente por las neuronas, pero sólo en condiciones de neurodegeneración por los astrocitos, hay que tener en cuenta que la respuesta del sistema nervioso a la terapia estrogénica variará dependiendo del estado en el que se encuentre.

5. ESTUDIO DEL EFECTO DEL IGF-I SOBRE LAS VÍAS DE PI3K Y MAPKS EN ASTROCITOS Y NEURONAS Y DE SU INTERACCIÓN CON LA ACTIVIDAD AROMATASA Y EL ESTRADIOL EXÓGENO

El IGF-I es un factor trófico que a nivel cerebral tiene múltiples funciones (Åberg ND y cols., 2006). Está implicado en la regulación del crecimiento cerebral (DiCicco Bloom E y Black IB, 1988; Ye P y cols., 1996; Arsenijevic Y y cols., 2001), de la mielinización y de la sinaptogénesis (O'Kusky JR y cols., 2000). Aparte, tiene efectos neuroprotectores (Guan J y cols., 1993; Delaney CL y cols., 1999; Russell JW y cols., 1998; Takadera T y cols., 1999; Van Golen CM y Feldman EL. 2000), induce neurogénesis (O'Kusky JR y cols., 2000; Åberg MAI y cols., 2000; Lopez-Lopez C y cols., 2004), además de la génesis de otras células del cerebro (Hsieh J y cols., 2004), migración y diferenciación (Åberg MAI y cols., 2000; Lopez-Lopez C y cols., 2004; Fukudome Y y cols., 2003). Todos estos efectos son realizados a través de su receptor tirosina quinasa, que activa las vías de señalización de la PI3K y de las MAPKs. Se han descrito multitud de interacciones funcionales entre el estradiol y el IGF-I (Perez-Martin M y cols., 2003; Shughrue PJ y Merchenthaler I. 2000; Ma ZQ y cols., 1994; Patrone C y cols., 1998; Mendez P y Garcia-Segura LM, 2006; Ivanova T y cols., 2002; Wilson ME y cols., 2002; Znamensky V y cols., 2003; Bi R y cols., 2001; Cardona-

DISCUSIÓN

Gómez GP y cols., 2001, 2002a, 2002b). Así pues, el estrógeno induce la expresión del IGF-I (Kapur S y cols., 1992; Michels KM y cols., 1993), de su receptor (Cardona-Gómez GP y cols., 2000a; 67; El-Bakri NK y cols., 2004) y de las proteínas de unión a IGF (IGFBPs) (Krywicky RF y cols., 1993; Owens PC y cols., 1993). Y por su parte, el IGF-I regula la acción del estrógeno estimulando su síntesis (Constantino CX y cols., 1991; Erickson GF y cols., 1989; Hernandez ER y cols., 1988) y la de sus receptores (Cardona-Gómez GP y cols., 2001). Por todo ello, y teniendo en cuenta que el estradiol regula la actividad de las dos vías de señalización principales del receptor de IGF-I en el cerebro (Cardona-Gómez GP y cols., 2001, 2002a, 2002b; Wilson ME y cols., 2002; Bi R y cols., 2001; Znamensky V y cols., 2003; Ivanova T y cols., 2002), nos planteamos analizar el efecto de la interacción de ambas hormonas sobre el estado de activación de dichas vías en cultivos primarios de neuronas de corteza cerebral y de astrocitos de corteza cerebral y de hipocampo.

Como era de esperar, un tratamiento de 20 minutos de IGF-I a una concentración 100nM, similar a la presente en la sangre y el líquido cefalorraquídeo (Chen C y cols., 2001), incrementó los niveles de fosforilación de Akt, de GSK3 β y de ERK1/2, tanto en las neuronas y los astrocitos de corteza cerebral, como en los astrocitos de hipocampo. Esta activación de las vías de la PI3K y de las MAPKs por IGF-I, resultó ser independiente del estradiol exógeno ya que el tratamiento con estradiol, independientemente de durar 20 minutos o 28 horas, no modificó la activación generada por el IGF-I sobre las vías. Anteriormente, ya se había observado la falta de efecto sinérgico del IGF-I y el estradiol en la inducción de supervivencia y diferenciación de neuronas de hipotálamo (Dueñas M y cols., 1996) y en la activación de la vía de las MAPKs en hipotálamo (Cardona-Gomez GP y cols., 2002). Además, los resultados del estudio anterior, que indicaban que el estradiol exógeno en condiciones normales no tenía capacidad de activar las vías de la PI3K ni de las MAPKs, daban pie a esperar esta ausencia de efecto del estradiol exógeno sobre la activación inducida por el IGF-I.

Teniendo en cuenta que la actividad de la aromatasa endógena regula la respuesta de las quinasas de las vías de la PI3K y de las MAPKs a una administración exógena de estradiol, en astrocitos y neuronas de corteza cerebral, nos pareció interesante estudiar si la actividad de dicha enzima también regulaba el efecto del IGF-I sobre las vías de la PI3K y de las MAPKs. Los datos mostraron que la actividad de la aromatasa endógena sólo regula la respuesta de la vía de las MAPKs a la administración de IGF-I. El efecto del IGF-I sobre la vía de la PI3K, resultó ser completamente independiente de la actividad de la aromatasa. Así pues, en ninguno

de los tipos celulares, ni de las regiones cerebrales estudiadas, hubo cambios en los niveles de fosforilación inducidos por el IGF-I en Akt o en GSK3 β , como consecuencia de la inhibición de la aromatasa.

Por su parte, la regulación que la aromatasa ejerce sobre la activación que el IGF-I induce en la vía de las MAPKs, es exclusiva de astrocitos y específica de la región cerebral de la que proceden.

En astrocitos de corteza cerebral, la administración de letrozol, potenció la capacidad del IGF-I de activar la vía de las MAPKs, aunque sólo en el caso de ERK1 la fosforilación llegó a ser significativamente mayor a la inducida por el IGF-I. Este resultado sugiere que, en los astrocitos de corteza cerebral, el estradiol inhibe la activación de ERK1. De hecho, en presencia de letrozol, la administración de estradiol durante los 20 minutos finales del experimento, consiguió que el nivel de fosforilación de ERK1 retornara al nivel observado tras el tratamiento con IGF-I. Aunque se necesitaría más información para poder determinar el mecanismo por el que el estradiol sintetizado por la aromatasa ejerce su inhibición, una opción sería que el estradiol active alguna fosfatasa (Yi KD y cols., 2008; Yi KD y cols., 2005) que disminuya la fosforilación de ERK1. Finalmente, la inhibición de los receptores de estrógeno mediante la administración de ICI182780 no modificó la capacidad del IGF-I de activar ERK1. En estudios sobre la capacidad del estradiol de estimular el crecimiento del axón en neuronas hipotálamicas (Cambiasso MJ y Carrer HF, 2001) ya se había observado la posibilidad de que el estradiol actuara por mecanismos independientes al sistema de transducción de señal de los receptores intracelulares clásicos.

En astrocitos de corteza cerebral, el estradiol ejerce efectos opuestos sobre la vía de las MAPKs, dependiendo del mecanismo de acción. El estradiol administrado tras el bloqueo de la aromatasa requiere una aplicación de 28 horas para incrementar el estado de activación de la vía, lo que sugiere que actúa a través de un mecanismo lento, dependiente de la activación transcripcional (Balthazart J y cols., 2003; Vasudevan N y cols., 2005). Por otra parte, dicho estradiol reduce la activación que el IGF-I promueve sobre ERK1 con un tratamiento corto, de tan sólo 20 minutos, lo que sugiere que está actuando a través de mecanismos rápidos de los que se inician a nivel de membrana (Abraham IM y cols., 2004; Garcia-Segura LM y cols., 1987).

En astrocitos de hipocampo, la regulación que la aromatasa ejerce sobre la capacidad del IGF-I de activar la vía de las MAPKs es justo la contraria a la ejercida en

DISCUSIÓN

los astrocitos de corteza cerebral. Anteriormente ya comentamos que ERK1 y ERK2 no siempre muestran patrones similares de activación (Lloyd AC, 2006; Vantaggiato C y cols., 2006; Lefloch R y cols., 2008). Así pues, en presencia de letrozol, la capacidad del IGF-I de activar la vía de las MAPKs se ve reducida de tal manera, que los niveles de fosforilación de ERK1/2 son similares a los inducidos por el letrozol, llegando sólo en el caso de ERK2 a desaparecer las diferencias significativas con el grupo control. Esta inhibición experimentada por ERK2 no fue revertida por el tratamiento con estradiol exógeno, independientemente de ser administrado durante 20 minutos o 28 horas. Así pues, la capacidad del IGF-I de activar ERK2 es dependiente de la actividad de la aromatasa pero parece ser independiente del estradiol producido por la enzima. Una posible explicación es que un aumento en los niveles de testosterona, como consecuencia de la inhibición de la enzima aromatasa, pudiera ser la causa de la reducción del efecto del IGF-I sobre la fosforilación de ERK2. Además, hay estudios en astrocitos de corteza en los que se comprueba que la administración de dihidrotestosterona (DHT), el metabolito no aromatizable de la testosterona, regula los niveles de fosforilación de ERK1/2 (Gatson JW y cols., 2006). Así pues sería posible que, en hipocampo, los andrógenos, acumulados por la inhibición de la aromatasa, actúen sobre sus receptores promoviendo la inactivación de ERK2 y reduzcan así la capacidad del IGF-I de activarla.

La regulación del efecto del IGF-I sobre ERK2 es todavía más compleja ya que aunque sea independiente del estradiol, no lo es de sus receptores. Así pues, el tratamiento con ICI182780 durante 28 horas bloqueó completamente la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de ERK2. Esta dependencia de los receptores de estrógeno ya se había observado anteriormente en la capacidad del IGF-I de promover neurogénesis en el giro dentado (Perez-Martin M y cols., 2003), la diferenciación de las neuronas hipotalámicas (Dueñas M y cols., 1996) o la neuroprotección frente a la muerte inducida por ácido kaínico (Azcoitia I y cols., 1999).

La disminución en el nivel de fosforilación de ERK1 que provoca la inhibición de la aromatasa en la capacidad del IGF-I de promover su activación, fue menor a la observada en ERK2, de tal manera que se perdieron las diferencias significativas con el grupo del letrozol pero no con el grupo control. La administración de estradiol durante 28 horas consiguió recuperar los niveles de fosforilación de ERK1 inducidos por el IGF-I sugiriendo que existe una acción sinérgica entre ambas hormonas, como ya se había observado anteriormente que podía ocurrir (Cardona-Gomez GP y cols., 2002). Nuevamente, la necesidad de un tratamiento largo para conseguir este efecto,

sugiere que es un mecanismo de regulación transcripcional el que emplea el estradiol para colaborar con el IGF-I en la activación de ERK1. Sin embargo, la inhibición de los receptores de estrógeno no modificó el nivel de fosforilación de ERK1, por lo que la acción sinérgica del estradiol y del IGF-I es independiente de los receptores de estrógeno clásicos.

Finalmente, en neuronas de corteza cerebral, como ya se comentó, la aromatasa no regula la capacidad del IGF-I de activar la vía de la PI3K, ni la de las MAPKs. Sin embargo, aunque el efecto del IGF-I sobre ambas vías no sea dependiente del estradiol, sí que lo es de sus receptores. De hecho, la administración de ICI182780 bloqueó la capacidad del IGF-I de incrementar el nivel de fosforilación de ERK1, mientras que potenció la de incrementar los niveles de fosforilación de Akt y de GSK3 β . La inhibición de los receptores de estrógeno durante los últimos 50 minutos del experimento potenció la capacidad del IGF-I de incrementar los niveles de fosforilación de Akt y de GSK3 β . Sin embargo, si el bloqueo de los receptores de estrógeno se realiza durante 28 horas, desaparece la ganancia de efecto que, con la inhibición corta, experimenta el IGF-I sobre Akt. Parece pues, que la activación de GSK3 β es más persistente que la de Akt, por lo que tras 28h de inhibición de los receptores de estrógeno, Akt ya ha recuperado el nivel de fosforilación que en condiciones normales induce el IGF-I, mientras que en el caso de GSK3 β , sigue siendo mayor.

En corteza cerebral, el ER α no tiene la capacidad de activar ERK en respuesta a estrógeno, pero sí que la tiene de inhibirla (Singh M y cols., 2000; Toran-Allerand CD, 2005). Teniendo en cuenta estos estudios y que el tratamiento con ICI182780 incrementó el nivel de ER α en neuronas de corteza, podría suponerse que la pérdida de efecto del IGF-I sobre la activación de ERK1 por el tratamiento con ICI182780, se debe, en parte, al incremento en la expresión de ER α que dicho tratamiento promueve, y no sólo a la inhibición de los receptores estrógenos necesarios para la señalización del IGF-I (Perez-Martin M y cols., 2003; Dueñas M y cols., 1996; Azcoitia I y cols., 1999).

CONCLUSIONES

1. En el hipocampo, la corteza prefrontal y el cerebelo de rata, las vías de la PI3K y de las MAPK se ven afectadas por el paso del tiempo tras la ovariectomía de diferente manera en función de la edad a la que se realice la operación. Por el contrario, en el hipotálamo de rata, los cambios observados por el paso del tiempo tras la ovariectomía en las vías de la PI3K y de las MAPKs, no se ven afectados por la edad a la que los animales son operados o sacrificados.
2. El efecto del paso del tiempo tras la ovariectomía sobre el estado de activación de las vías de la PI3K y de las MAPKs muestra especificidad de tejido, y lo incrementa en el hipocampo, el hipotálamo y la corteza prefrontal, mientras que lo disminuye en el cerebelo.
3. En corteza prefrontal de rata el estradiol pierde la capacidad de activar la vía de la PI3K en animales ovariectomizados antes de la pubertad. Parece que durante la pubertad, las hormonas ováricas programan la corteza prefrontal para responder a una futura regulación del estradiol sobre los niveles de fosforilación de Akt y de GSK3 β .
4. La regulación que las hormonas ováricas ejercen sobre la capacidad de la corteza prefrontal de responder a un tratamiento con estradiol no se debe a modificaciones en la expresión, ni en la localización subcelular del ER α ni del IGF-IR.
5. Los niveles de expresión de los receptores de estrógeno y de IGF-I a pesar de la interacción funcional que presentan en el cerebro, no responden conforme a un mismo patrón, al tratamiento con estradiol, al envejecimiento o a los cambios ocasionados por la ovariectomía.
6. El estradiol sintetizado por la aromatasa, regula la activación de la vía de las MAPKs, pero no la de la PI3K, en neuronas de corteza de rata en cultivo.
7. La aromatasa, independientemente de la síntesis de estradiol, regula la capacidad del estradiol exógeno de modular la activación de las vías de la PI3K y de las MAPKs en astrocitos de corteza de rata en cultivo.
8. Ni la aromatasa, ni el estradiol exógeno modifican el grado de activación de las vías de la PI3K y de las MAPKs en astrocitos de hipocampo de rata en cultivo.

CONCLUSIONES

9. La actividad de la aromatasa regula la activación que el IGF-I induce en la vía de las MAPKs, mientras que no tiene efecto sobre la vía de la PI3K. Dicha regulación es exclusiva de astrocitos de rata en cultivo y dependiente de la región cerebral de la que procedan.

10. En neuronas de corteza cerebral de rata en cultivo, el efecto del IGF-I sobre las vías de la PI3K y de las MAPKs, aunque no sea regulado por el estradiol, es dependiente de los receptores de estrógeno.

BIBLIOGRAFÍA

Åberg MAI, Åberg ND, Hedbäcker H, Oscarsson J, Eriksson PS. 2000. Peripheral infusion of IGF-I selectively induces neurogenesis in the adult rat hippocampus. *J. Neurosci.* 20:2896–2903.

Abraham IM, Todman MG, Korach KS, Herbison AE. 2004. Critical in vivo roles for classical estrogen receptors in rapid estrogen actions on intracellular signaling in mouse brain. *Endocrinology.* 145:3055–3061.

Aleman A, Verhaar HJ, De Haan EH, De Vries WR, Samson MM, Drent ML, Van der Veen EA, Koppeschaar HP. 1999. Insulin-like growth factor-I and cognitive function in healthy older men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 471–475.

Alessi DR, Andjelkovic M, Caudwell B, Cron P, Morrice N, Cohen P, Hemmings BA. 1996. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15(23):6541-6551.

Alkayed NJ, Harukuni I, Kimes AS, London ED, Traystman RJ, Hurn PD. 1998. Gender-linked brain injury in experimental stroke. *Stroke.* 29(1):159-165.

Amateau SK, McCarthy MM. 2004. Induction of PGE(2) by estradiol mediates developmental masculinization of sex behavior. *Nat Neurosci.* 7:643–650.

Arevalo JC, Chao MV. 2005. Axonal growth: where neurotrophins meet Wnts. *Curr Opin Cell Biol.* 17:112-115.

Arsenijevic Y, Weiss S, Schneider B, Aebischer P. 2001. Insulin-like growth factor-I is necessary for neural stem cell proliferation and demonstrates distinct actions of epidermal growth factor and fibroblast growth factor-2. *J. Neurosci.* 21:7194–7202.

Ascenzi P, Bocedi A, Marino M. 2006. Structure-function relationship of estrogen receptor alpha and beta: impact on human health. *Mol Aspects Med.* 27(4):299-402.

Assinder SJ, Dong Q, Kovacevic Z, Richardson DR. 2009 .The TGF-beta, PI3K/Akt and PTEN pathways: established and proposed biochemical integration in prostate cancer. *Biochem J.* 417(2):411-421.

Azcoitia I, Sierra A, Garcia-Segura LM. 1999. Neuroprotective effects of estradiol in the adult rat hippocampus: interaction with insulin-like growth factor-I signalling. *J. Neurosci. Res.* 58:815–822.

BIBLIOGRAFÍA

Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Honda S, Harada N, Garcia-Segura LM. 2001. Brain aromatase is neuroprotective. *J Neurobiol.* 47:318–329.

Azcoitia I, DonCarlos LL, Garcia-Segura LM. 2002. Estrogen and brain vulnerability. *Neurotox Res.* 4(3):235-245.

Azcoitia I, DonCarlos LL, Garcia-Segura LM. 2003a. Are gonadal steroid hormones involved in disorders of brain aging? *Aging Cell.* 2:31–37.

Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Garcia-Segura LM. 2003b. Aromatase expression by reactive astroglia is neuroprotective. *Ann N Y Acad Sci.* 1007:298-305.

Azcoitia I, Sierra A, Veiga S, Garcia-Segura LM. 2005. Brain steroidogenesis: emerging therapeutic strategies to prevent neurodegeneration. *J Neural Transm.* 112:171–176.

Bach MA, Shen-Orr Z, Lowe WL Jr, Roberts CT Jr, LeRoith D. 1991. Insulin-like growth factor I mRNA levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 10:43-48.

Bagetta G, Chiappetta O, Amantea D, Iannone M, Rotiroti D, Costa A, Nappi G, Corasaniti MT. 2004. Estradiol reduces cytochrome c translocation and minimizes hippocampal damage caused by transient global ischemia in rat. *Neurosci. Lett.* 368(1):87-91.

Bakker J, Pool CW, Sonnemans M, van Leeuwen FW, Slob AK. 1997. Quantitative estimation of estrogen and androgen receptorimmunoreactive cells in the forebrain of neonatally estrogen-deprived male rats. *Neuroscience.* 77:911–919.

Balthazart J, Ball GF. 1998. New insights into the regulation and function of brain estrogen synthase (aromatase). *Trends Neurosci.* 21(6):243-249.

Balthazart J, Baillien M, Charlier TD, Cornil CA, Ball GF. 2003. Multiple mechanisms control brain aromatase activity at the genomic and non-genomic level. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 86(3-5):367-379.

Balthazart J, Baillien M, Ball GF. 2006a. Rapid control of brain aromatase activity by glutamatergic inputs. *Endocrinology.* 147: 359–366.

Balthazart J, Cornil CA, Taziaux M, Charlier TD, Baillien M, Ball GF. 2006b. Rapid changes in production and behavioral action of estrogens. *Neuroscience.* 138:783–791.

- Beato M. 1989. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*. 56:335–344.
- Behl C. 2002. Sex hormones, neuroprotection and cognition. *Prog Brain Res*. 138:135-142.
- Behl C, Moosmann B. 2002. Oxidative nerve cell death in Alzheimer's disease and stroke: antioxidants as neuroprotective compounds. *Biol Chem*. 383:521–536.
- Behl C, Skutella T, Lezoualch F, Post A, Widmann M, Newton CJ, Holsboer F. 1997. Neuroprotection against oxidative stress by estrogens: structure-activity relationship. *Mol. Pharmacol*. 51:535-541.
- Benito M, Valverde AM, Lorenzo M. 1996. IGF-I: a mitogen also involved in differentiation processes in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 28:499–510.
- Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. 1986. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 83(8):2496-2500.
- Beyer C, Raab H. 1998. Nongenomic effects of oestrogen: embryonic mouse midbrain neurones respond with a rapid release of calcium from intracellular stores. *Eur. J. Neurosci*. 10:255–262.
- Bondy CA, Lee WH. 1993. Patterns of insulin-like growth factor and IGF receptor gene expression in the brain. Functional implications. *Ann N Y Acad Sci*. 692:33-43.
- Bondy CA, Cheng CM. 2004. Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur J Pharmacol*. 490:25-31.
- Brown TJ, MacLusky NJ, Shanabrough M, Naftolin F. 1990. Comparison of age- and sex-related changes in cell nuclear estrogen-binding capacity and progestin receptor induction in the rat brain. *Endocrinology*. 126(6):2965-2972.
- Bruce-Keller AJ, Keeling JL, Keller JN, Huang FF, Camondola S, Mattson MP. 2000. Antiinflammatory effects of estrogen on microglial activation. *Endocrinology*. 141(10):3646-3656.
- Brunet A, Bonni A, Zigmond MJ, Lin MZ, Juo P, Hu LS, Anderson MJ, Arden KC, Blenis J, Greenberg ME. 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*. 96:857-868.

BIBLIOGRAFÍA

Bryant DN, Sheldahl LC, Marriott LK, Shapiro RA, Dorsa DM. 2006. Multiple pathways transmit neuroprotective effects of gonadal steroids. *Endocrine*. 29(2):199-207.

Calizo LH, Flanagan-Cato LM. 2000. Estrogen selectively regulates spine density within the dendritic arbor of rat ventromedial hypothalamic neurons. *J Neurosci*. 20:1589–1596.

Cambiasso MJ, Colombo JA, Carrer HF. 2000. Differential effect of oestradiol and astroglia-conditioned media on the growth of hypothalamic neurons from male and female rat brains. *Eur J Neurosci*. 12:2291–2298.

Cambiasso MJ, Carrer HF. 2001. Nongenomic mechanism mediates estradiol stimulation of axon growth in male rat hypothalamic neurons in vitro. *J Neurosci Res*. 66(3):475-481.

Cardona-Gómez GP, Chowen JA, Garcia-Segura LM. 2000a. Estradiol and progesterone regulate the expression of insulin-like growth factor-I receptor and insulin-like growth factor binding protein-2 in the hypothalamus of adult female rats. *J Neurobiol*. 43:269-281.

Cardona-Gómez GP, DonCarlos L, Garcia-Segura LM. 2000b. Insulin-like growth factor I receptors and estrogen receptors colocalize in female rat brain. *Neuroscience*. 99:751-760.

Cardona-Gómez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2001. Interactions of estrogens and insulin-like growth factor-I in the brain: implications for neuroprotection. *Brain Res Brain Res Rev*. 37:320-334.

Cardona-Gómez GP, Mendez P, DonCarlos LL, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2002a. Interactions of estrogen and insulin-like growth factor-I in the brain: molecular mechanisms and functional implications. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 83:211-217.

Cardona-Gómez GP, Mendez P, Garcia-Segura LM. 2002b. Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res*. 107:80-88.

Cardona-Gómez GP, Perez M, Avila J, Garcia-Segura LM, Wandosell F. 2004. Estradiol inhibits GSK3 and regulates interaction of estrogen receptors, GSK3, and beta-catenin in the hippocampus. *Mol Cell Neurosci*. 25:363-373.

Carrer HF, Araque A, Buño W. 2003. Estradiol regulates the slow Ca²⁺-activated K⁺ current in hippocampal pyramidal neurons. *J. Neurosci*. 23:6338–6344.

Carrer HF, Cambiasso MJ, Gorosito S. 2005. Effects of estrogen on neuronal growth and differentiation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 93:319–323.

- Carro E, Torres-Aleman I. 2004. The role of insulin and insulin-like growth factor I in the molecular and cellular mechanisms underlying the pathology of Alzheimer's disease. *Eur. J. Pharmacol.* 490, 127–133.
- Carswell HV, Dominiczak AF, Garcia-Segura LM, Harada N, Hutchison JB, Macrae IM. 2005. Brain aromatase expression after experimental stroke: Topography and time course. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 96:89-91.
- Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F. 2001. PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J.* 20(21):6050-6059.
- Chakraborty TR, Ng L, Gore AC. 2003. Age-related changes in estrogen receptor beta in rat hypothalamus: a quantitative analysis. *Endocrinology.* 144(9):4164-4171.
- Chakraborty TR, Gore AC. 2004. Aging-related changes in ovarian hormones, their receptors, and neuroendocrine function. *Exp Biol Med (Maywood).* 229(10):977-987.
- Charalampopoulos I, Remboutsika E, Margioris AN, Gravanis A. 2008. Neurosteroids as modulators of neurogenesis and neuronal survival. *Trends Endocrinol Metab.* 19(8):300-307.
- Charest DL, Mordret G, Harder KW, Jirik F, Pelech SL 1993. Molecular cloning, expression, and characterization of the human mitogen-activated protein kinase p44erk1. *Mol Cell Biol.* 13(8):4679-4690.
- Chen C, Zhu YF, Liu XJ, Lu ZX, Xie Q, Ling N. 2001. Discovery of a series of nonpeptide small molecules that inhibit the binding of insulin-like growth factor (IGF) to IGF-binding proteins. *J Med Chem.* 44(23):4001-4010.
- Choi JS, Kim SJ, Shin JA, Lee KE, Park EM. 2008. Effects of estrogen on temporal expressions of IL-1beta and IL-1ra in rat organotypic hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation. *Neurosci Lett.* 438(2):233-237.
- Chong ZZ, Li F, Maiese K. 2005. Activating Akt and the brain's resources to drive cellular survival and prevent inflammatory injury. *Histol Histopathol.* 20(1):299-315.
- Chowen JA, Torres-Aleman I, Garcia-Segura LM. 1992. Trophic effects of estradiol on fetal rat hypothalamic neurons. *Neuroendocrinology.* 56(6):895-901.
- Cohen P, Frame S. 2001. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(10):769-776.

BIBLIOGRAFÍA

Chung YH, Shin CM, Joo KM, Kim MJ, Cha CI. 2002. Region-specific alterations in insulin-like growth factor receptor type I in the cerebral cortex and hippocampus of aged rats. *Brain Res.* 946(2):307-13

Cimarosti H, Zamin LL, Frozza R, Nassif M, Horn AP, Tavares A, Netto CA, Salbego C. 2005. Estradiol protects against oxygen and glucose deprivation in rat hippocampal organotypic cultures and activates Akt and inactivates GSK-3beta. *Neurochem Res.* 30:191-199.

Constantino CX, Keyes PL, Kostyo JL. 1991. Insulin-like growth factor-I stimulates steroidogenesis in rabbit luteal cells. *Endocrinology.* 128:1702-1708.

Cooke BM, Woolley CS. 2005. Gonadal hormone modulation of dendrites in the mammalian CNS. *J Neurobiol.* 64(1):34-46.

Cross DA, Alessi DR, Cohen P, Andjelkovich M, Hemmings BA. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 378:785-789.

Cyr M, Ghribi O, Di Paolo T. 2000. Regional and selective effects of oestradiol and progesterone on NMDA and AMPA receptors in the rat brain. *J Neuroendocrinol.* 12(5):445-452.

Cyr M, Ghribi O, Thibault C, Morissette M, Landry M, Di Paolo T. 2001. Ovarian steroids and selective estrogen receptor modulators activity on rat brain NMDA and AMPA receptors. *Brain Res Brain Res Rev.* 37(1-3):153-161.

Darnaudéry M, Perez-Martin M, Bélizaire G, Maccari S, Garcia-Segura LM. 2006. Insulin-like growth factor 1 reduces age-related disorders induced by prenatal stress in female rats. *Neurobiol Aging.* 27(1):119-127.

D'Astous M, Mendez P, Morissette M, Garcia-Segura LM, Di Paolo T. 2006. Implication of the phosphatidylinositol-3 kinase/protein kinase B signaling pathway in the neuroprotective effect of estradiol in the striatum of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mice. *Mol Pharmacol.* 69(4):1492-1498.

Day M, Good M. 2005. Ovariectomy-induced disruption of long-term synaptic depression in the hippocampal CA1 region in vivo is attenuated with chronic estrogen replacement. *Neurobiol Learn Mem.* 83(1):13-21.

De Bellis MD, Keshavan MS, Beers SR, Hall J, Frustaci K, Masalehdan A, Noll J, Boring AM. 2001. Sex differences in brain maturation during childhood and adolescence. *Cereb Cortex*. 11:552-557.

del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. 1997. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*. 278:687-689.

Delaney CL, Cheng HL, Feldman EL. 1999. Insulin-like growth factor-I prevents caspase-mediated apoptosis in Schwann cells. *J. Neurobiol.* 41:540-548.

Dhandapani KM, Wade FM, Mahesh VB, Brann DW. 2005. Astrocyte-derived transforming growth factor- β mediates the neuroprotective effects of 17 β -estradiol: involvement of nonclassical genomic signaling pathways. *Endocrinology*. 146(6):2749-2759.

Dhandapani KM, Brann DW. 2007. Role of astrocytes in estrogen-mediated neuroprotection. *Exp Gerontol.* 42(1-2):70-75.

Diaz H, Lorenzo A, Carrer HF, Caceres A. 1992. Time lapse study of neurite growth in hypothalamic dissociated neurons in culture: sex differences and estrogen effects. *J. Neurosci. Res.* 33:266-281.

DiCicco Bloom E, Black IB. 1988. Insulin growth factors regulate the mitotic cycle in cultured rat sympathetic neuroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85:4066-4070.

Dominguez R, Liu R, Baudry M. 2007. 17-Beta-estradiol-mediated activation of extracellular-signal regulated kinase, phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B-Akt and N-methyl-D-aspartate receptor phosphorylation in cortical synaptoneurosomes. *J Neurochem.* 101:232-240.

Dowsett M, Jones A, Johnston SR, Jacobs S, Trunet P, Smith IE. 1995. In vivo measurement of aromatase inhibition by letrozole (CGS 20267) in postmenopausal patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1:1511-1515.

Duax WL, Weeks CM. 1980. Molecular basis of estrogenicity: X-ray crystallographic studies, en: McLachlan JA (ed), *Estrogens in the Environment*. Elsevier North Holland, New York, pp. I 1-3 I.

Duax WL, Griffin JF, Weeks CM, Wawrzak Z. 1988. The mechanism of action of steroid antagonists: insights from crystallographic studies. *J Steroid Biochem.* 31(4B):481-492.

Dubal DB, Shughrue PJ, Wilson ME, Merchenthaler I, Wise PM. 1999. Estradiol modulates bcl-2 in cerebral ischemia: a potential role for estrogen receptors. *J. Neurosci.* 19(15):6385-6393.

BIBLIOGRAFÍA

Dueñas M, Torres–Aleman I, Naftolin F, Garcia–Segura LM. 1996. Interaction of insulin-like growth factor-I and estradiol signaling pathways on hypothalamic neuronal differentiation. *Neuroscience*. 74:531–539.

El-Bakri NK, Islam A, Suliman I, Lindgren U, Winblad B, Adem A. 2004. Ovariectomy and gonadal hormone treatment: effects on insulin-like growth factor-1 receptors in the rat brain. *Growth Horm IGF Res*. 14:388-393.

Erickson GF, Garzo VG, Magoffin DA. 1989. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) regulates aromatase activity in human granulosa luteal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab*. 69:716 –724.

Etgen AM, Gonzalez-Flores O, Todd BJ. 2006. The role of insulin-like growth factor-I and growth factor-associated signal transduction pathways in estradiol and progesterone facilitation of female reproductive behaviors. *Front Neuroendocrinol*. 27:363-375.

Ferreira A, Caceres A. 1991. Estrogen-enhanced neurite growth: evidence for a selective induction of Tau and stable microtubules. *J. Neurosci*. 11:392-400.

Fester L, Ribeiro-Gouveia V, Prange-Kiel J, von Schassen C, Bottner M, Jarry H, Rune GM. 2006. Proliferation and apoptosis of hippocampal granule cells require local oestrogen synthesis. *J Neurochem*. 97:1136–1144.

Flores F, Naftolin F, Ryan KJ, White RJ. 1973. Estrogen formation by the isolated perfused rhesus monkey brain. *Science*. 180(90):1074-1075.

Forger NG. 2006. Cell death and sexual differentiation of the nervous system. *Neuroscience*. 138:929–938.

Fukudome Y, Tabata T, Miyoshi T, Haruki S, Araishi K, Sawada S, Kano M. 2003. Insulin-like growth factor-I as a promoting factor for cerebellar Purkinje cell development. *Eur. J. Neurosci*. 17:2006–2016.

Funabashi T, Kleopoulos SP, Brooks PJ, Kimura F, Pfaff DW, Shinohara K, Mobbs CV. 2000. Changes in estrogenic regulation of estrogen receptor alpha mRNA and progesterone receptor mRNA in the female rat hypothalamus during aging: an in situ hybridization study. *Neurosci Res*. 38(1):85-92.

Fusani L, Gahr M. 2006. Hormonal influence on song structure and organization: the role of estrogen. *Neuroscience*. 138:939–946.

Galea LA, Spritzer MD, Barker JM, Pawluski JL. 2006. Gonadal hormone modulation of hippocampal neurogenesis in the adult. *Hippocampus*. 16(3):225-232.

Galien R, Garcia T. 1997. Estrogen receptor impairs interleukin-6 expression by preventing protein binding on the NF- κ B site. *Nucleic Acids Res*. 25:2424-2429.

Galmiche G, Corvaisier S, Kottler ML. 2006a. Aromatase gene expression and regulation in the female rat pituitary. *Ann N Y Acad Sci*. 1070:286-292.

Galmiche G, Richard N, Corvaisier S, Kottler ML. 2006b. The expression of aromatase in gonadotropes is regulated by estradiol and gonadotropin-releasing hormone in a manner that differs from the regulation of luteinizing hormone. *Endocrinology*. 147(9):4234-4244.

Garcia-Segura LM, Olmos G, Tranque P, Naftolin F. 1987. Rapid effects of gonadal steroids upon hypothalamic neuronal membrane ultrastructure. *J Steroid Biochem*. 27:615-623.

Garcia-Segura LM, Perez J, Pons S, Rejas MT, Torres-Aleman I. 1991. Localization of insulin-like growth factor I (IGF-I) like immunoreactivity in the developing and adult rat brain. *Brain Res*. 560:167-174.

Garcia-Segura LM, Chowen JA, Parducz A, Naftolin F. 1994. Gonadal hormones as promoters of structural synaptic plasticity: cellular mechanisms. *Prog. Neurobiol*. 44(3):279-307.

Garcia-Segura LM, Cardona-Gomez P, Naftolin F, Chowen JA. 1998. Estradiol upregulates Bcl-2 expression in adult brain neurons. *Neuroreport*. 9(4):593-597.

Garcia-Segura LM, Wozniak A, Azcoitia I, Rodriguez JR, Hutchison RE, Hutchison JB. 1999. Aromatase expression by astrocytes after brain injury: implications for local estrogen formation in brain repair. *Neuroscience*. 89:567-578.

Garcia-Segura LM, Cardona-Gomez GP, Chowen JA, Azcoitia I. 2000. Insulin-like growth factor-I receptors and estrogen receptors interact in the promotion of neuronal survival and neuroprotection. *J. Neurocytol*. 29:425-437.

Garcia-Segura LM, Azcoitia I, DonCarlos LL. 2001. Neuroprotection by estradiol. *Prog Neurobiol*. 63(1):29-60.

Garcia-Segura LM, McCarthy MM. 2004. Minireview: Role of glia in neuroendocrine function. *Endocrinology*. 145(3):1082-1086.

BIBLIOGRAFÍA

Garcia-Segura LM, Sanz A, Mendez P. 2006. Cross-talk between IGF-I and estradiol in the brain: focus on neuroprotection. *Neuroendocrinology*. 84(4):275-279.

Garcia-Segura LM, Diz-Chaves Y, Perez-Martin M, Darnaudéry M. 2007. Estradiol, insulin-like growth factor-I and brain aging. *Psychoneuroendocrinology*. 32 Suppl 1:S57-61.

Garcia-Segura LM. 2008. Aromatase in the brain: not just for reproduction anymore. *J Neuroendocrinol*. 20(6):705-712.

Garrido JJ, Simon D, Varea O, Wandosell F. 2007. GSK3 alpha and GSK3 beta are necessary for axon formation. *FEBS Lett*. 581:1579-1586.

Gatson JW, Kaur P, Singh M. 2006. Dihydrotestosterone differentially modulates the mitogen-activated protein kinase and the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathways through the nuclear and novel membrane androgen receptor in C6 cells. *Endocrinology*. 147(4):2028-2034.

Gerlach JL, McEwen BS, Toran-Allerand CD, Friedman WJ. 1983. Perinatal development of estrogen receptors in mouse brain assessed by radioautography, nuclear isolation and receptor assay. *Brain Res*. 313:7-18.

Gibbs RB, Wu D, Hersh LB, Pfaff DW. 1994. Effects of estrogen replacement on the relative levels of choline acetyltransferase, trkA, and nerve growth factor messenger RNAs in the basal forebrain and hippocampal formation of adult rats. *Exp Neurol*. 129(1):70-80.

Giedd JN, Castellanos FX, Rajapakse JC, Vaituzis AC, Rapoport JL. 1997. Sexual dimorphism of the developing human brain. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 21:1185-1201.

Giedd JN, Blumenthal J, Jeffries NO, Castellanos FX, Liu H, Zijdenbos A, Paus T, Evans AC, Rapoport JL. 1999. Brain development during childhood and adolescence: a longitudinal MRI study. *Nat Neurosci*. 2:861-863.

Giedd JN. 2004. Structural magnetic resonance imaging of the adolescent brain. *Ann NY Acad Sci*. 1021:77-85.

Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL, Thompson PM. 2004. Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:8174-8179.

- Gollapudi L, Oblinger MM. 1999. Stable transfection of PC12 cells with estrogen receptor (ERalpha): protective effects of estrogen on cell survival after serum deprivation. *J. Neurosci. Res.* 56(1):99-108.
- Goodenough S, Schleusner D, Pietrzik C, Skutella T, Behl C. 2005. Glycogen synthase kinase 3beta links neuroprotection by 17beta-estradiol to key Alzheimer processes. *Neuroscience.* 132:581-589.
- Grohe C, Briesmeister G, Stimpel L, Karas RH, Vetter H, Neyses L. 1994. Functional estrogen receptors in myocardial and myogenic cells. *Circulation.* 90:I-538.
- Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H, Neyses L. 1997. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Letters.* 416:107-112.
- Grumbach MM. 2002. The neuroendocrinology of human puberty revisited. *Horm Res.* 57 Suppl 2:2-14.
- Guan J, Williams C, Gunning M, Mallard C, Gluckman P. 1993. The effects of IGF-1 treatment after hypoxic-ischemic brain injury in adult rats. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 13:609-616.
- Guerra-Araiza C, Amorim MA, Camacho-Arroyo I, Garcia-Segura LM. 2007. Effects of progesterone and its reduced metabolites, dihydroprogesterone and tetrahydroprogesterone, on the expression and phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 and the microtubule-associated protein tau in the rat cerebellum. *Dev Neurobiol.* 67(4):510-520.
- Guerra-Araiza C, Amorim MA, Pinto-Almazán R, González-Arenas A, Campos MG, Garcia-Segura LM. 2008. Regulation of the phosphoinositide-3 kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways by progesterone and its reduced metabolites in the rat brain. *J Neurosci Res.* 87(2):470-481.
- Hall JM, McDonnell DP. 1999. The estrogen receptor b-isoform (ERb) of the human estrogen receptor modulates ERa transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology.* 140:5566-5578.
- Handa RJ, Rodriguez EW, Fox CA, Jacobson CD. 1991. Characterization and distribution of estrogen receptors in the diencephalon of the gray short-tailed opossum. *Brain Res.* 539:6-10.
- Handelsman DJ, Spaliviero JA, Scott CD, Baxter RC. 1987. Hormonal regulation of the peripubertal surge of insulin-like growth factor-I in the rat. *Endocrinology.* 120:491-496.

BIBLIOGRAFÍA

Hatton WJ, von Bartheld CS. 1999. Analysis of cell death in the trochlear nucleus of the chick embryo: calibration of the optical disector counting method reveals systematic bias. *J Comp Neurol.* 409(2):169-186.

Hernandez ER, Resnick CE, Svoboda ME, Van Wyk J, Payne DW, Adashi EY. 1988. Somatomedin-C/insulin-like growth factor I as an enhancer of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells. *Endocrinology.* 122:1603-1612.

Hiney JK, Srivastava V, Nyberg CL, Ojeda SR, Dees WL. 1996. Insulin-like growth factor I of peripheral origin acts centrally to accelerate the initiation of female puberty. *Endocrinology.* 137:3717-3728.

Hodge RD, D'Ercole AJ, O'Kusky JR. 2007. Insulin-like growth factor-I (IGF-I) inhibits neuronal apoptosis in the developing cerebral cortex in vivo. *Int J Dev Neurosci.* 25:233-241.

Hojo Y, Hattori TA, Enami T, Furukawa A, Suzuki K, Ishii HT, Mukai H, Morrison JH, Janssen WG, Kominami S, Harada N, Kimoto T, Kawato S. 2004. Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017alpha and P450 aromatase localized in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(3):865-870.

Holzenberger M, Kappeler L, De Magalhaes Filho C. 2004. IGF-1 signaling and aging. *Exp. Gerontol.* 39:1761-1764.

Honda K, Sawada H, Kihara T, Urushitani M, Nakamizo T, Akaike A, Shimohama S. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase mediates neuroprotection by estrogen in cultured cortical neurons. *J Neurosci Res.* 60:321-327.

Hsieh J, Aimone JB, Kaspar BK, Kuwabara T, Nakashima K, Gage FH. 2004. IGF-I instructs multipotent adult neural progenitor cells to become oligodendrocytes. *J. Cell Biol.* 164: 111-122.

Iivonen S, Heikkinen T, Puolivali J, Helisalmi S, Hiltunen M, Soininen H, Tanila H. 2006. Effects of estradiol on spatial learning, hippocampal cytochrome P450 19, and estrogen alpha and beta mRNA levels in ovariectomized female mice. *Neuroscience.* 137:1143-1152.

Ivanova T, Karolczak M, Beyer C. 2001. Estrogen stimulates the mitogen-activated protein kinase pathway in midbrain astroglia. *Brain Res.* 889(1-2):264-269.

Ivanova T, Mendez P, Garcia-Segura LM, Beyer C. 2002. Rapid stimulation of the PI3-kinase/Akt signalling pathway in developing midbrain neurones by oestrogen. *J Neuroendocrinol.* 14(1):73-79.

Jacobson CD, Gorski RA. 1981. Neurogenesis of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in the rat. *J Comp Neurol.* 196:519–529.

Jones DM, Tucker BA, Rahimtula M, Mearow KM. 2003. The synergistic effects of NGF and IGF-1 on neurite growth in adult sensory neurons: convergence on the PI 3-kinase signaling pathway. *J Neurochem.* 86:1116-1128.

Jordan VC, Mittal S, Gosden B, Koch R, Lieberman ME. 1985. Structure-activity relationships of estrogens. *Environ Health Perspect.* 61:97-110.

Jordan VC. 2003a. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 1. Receptor interactions. *J. Med. Chem.* 46:883–908.

Jordan VC. 2003b. Antiestrogens and selective estrogen receptor modulators as multifunctional medicines. 2. Clinical considerations and new agents. *J. Med. Chem.* 46:1081–1111.

Jung-Testas I, Hu ZY, Baulieu EE, Robel P. 1989. Neurosteroids: biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology.* 125, 2083–2091.

Kapur S, Tamada H, Dey SK, Andrews GK. 1992. Expression of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and its receptor in the peri-implantation mouse uterus, and cell-specific regulation of IGF-I gene expression by estradiol and progesterone. *Biol. Reprod.* 46:208 –219.

Katagiri M, Hakeda Y, Chikazu D, Ogasawara T, Takato T, Kumegawa M, Nakamura K, Kawaguchi H. 2001. Mechanism of stimulation of osteoclastic bone resorption through Gas6/Tyro 3, a receptor tyrosine kinase signaling, in mouse osteoclasts. *J Biol Chem.* 276(10):7376-7382.

Keshamouni VG, Mattingly RR, Reddy KB 2002 Mechanism of 17- β -estradiol-induced Erk1/2 activation in breast cancer cells. A role for HER2 AND PKC δ . *J Biol Chem.* 277:22558–22565.

Koh PO, Won CK, Cho JH. 2006. Estradiol prevents the injury-induced decrease of Akt/glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation. *Neurosci Lett.* 404:303-308.

Kops GJ, de Ruiter ND, De Vries-Smits AM, Powell DR, Bos JL, Burgering BM. 1999. Direct control of the Forkhead transcription factor AFX by protein kinase B. *Nature.* 398:630-634.

BIBLIOGRAFÍA

Krywicki RF, Figueroa JA, Jackson JG, Kozelsky TW, Shimasaki S, Von Hoff DD, Yee D. 1993. Regulation of insulin-like growth factor binding proteins in ovarian cancer cells by oestrogen. *Eur. J. Cancer*. 29A:2015–2019.

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JÅ. 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:5925–5930.

Kumar R, Johnson BH, Thompson EB. 2004. In: McEwan, I.J. (Ed.), *Essay in Biochemistry: The Nuclear Receptor Superfamily*. Portland Press, London, pp. 27–39.

Lamberts SWJ, van den Beld AW, van der Lely AJ. 1997. The endocrinology of aging. *Science*. 278:419–424.

Lannigan DA. 2003. Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids*. 68:1–9.

Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzel T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, Del-Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gemsch J, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Glass CK, Rosenfeld MG, Rose DW. 1998. Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of NCoR and SMRT complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95:2920–2925.

Lee SJ, McEwen BS. 2001. Neurotrophic and neuroprotective actions of estrogens and their therapeutic implications. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 41:569–591.

Lefloch R, Pouysségur J, Lenormand P. 2008. Single and combined silencing of ERK1 and ERK2 reveals their positive contribution to growth signaling depending on their expression levels. *Mol Cell Biol*. 28(1):511–527.

Lephart ED. 1996a. A review of brain aromatase cytochrome P450. *Brain Res Rev*. 22:1–26.

Lephart ED. 1996b. Dimorphic expression of calbindin-D28K in the medial basal hypothalamus from perinatal male and female rats. *Brain Res Dev Brain Res*. 96(1-2):281–284.

Li X, Huang J, Yi P, Bambara RA, Hilf R, Muyan M. 2004. Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ERa/b heterodimer emulates functions of the ERa dimer in genomic estrogen signalling pathways. *Mol. Cell. Biol*. 24:7681–7694.

Lichtenwalner RJ, Forbes ME, Bennett SA, Lynch CD, Sonntag WE, Riddle DR. 2001. Intracerebroventricular infusion of insulin-like growth factor-I ameliorates the age-related decline in hippocampal neurogenesis. *Neuroscience* 107: 603–613.

Liu M, Hurn PD, Roselli CE, Alkayed NJ. 2007. Role of P450 aromatase in sex-specific astrocytic cell death. *J Cereb Blood Flow Metab.* 27(1):135-141.

Lloyd AC. 2006. Distinct functions for ERKs? *J Biol.* 5(5):13.

Lonard DM, Nawaz Z, Smith CL, O'Malley BW. 2000. The 26S proteasome is required for estrogen receptor-alpha and coactivator turnover and for efficient estrogen receptor-alpha transactivation. *Mol Cell.* 5(6):939-948.

Long X, Nephew KP. 2006. Fulvestrant (ICI 182,780)-dependent interacting proteins mediate immobilization and degradation of estrogen receptor-alpha. *J Biol Chem.* 281(14):9607-9615.

Lopez-Lopez C, LeRoith D, Torres-Aleman I. 2004. Insulin-like growth factor I is required for vessel remodeling in the adult brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:9833-9838.

Lorenzo A, Díaz H, Carrer H, Cáceres A. 1992. Amygdala neurons in vitro: neurite growth and effects of estradiol. *J Neurosci Res.* 33(3):418-435.

Loven MA, Wood JR, Nardulli AM. 2001a. Interaction of estrogen receptors a and b with estrogen response elements. *Mol. Cell. Endocrinol.* 181:151-163.

Loven MA, Likhite VS, Choi I, Nardulli AM. 2001b. Estrogen response elements alter coactivator recruitment through allosteric modulation of estrogen receptor b conformation. *J. Biol. Chem.* 276:45282-45288.

Lu H, Nishi M, Matsuda K, Kawata M. 2004. Estrogen reduces the neurite growth of serotonergic cells expressing estrogen receptors. *Neurosci Res.* 50: 23-28.

Ma ZQ, Santagati S, Patrone C, Pollio G, Vegeto E, Maggi A. 1994. Insulin-like growth factors activate estrogen receptor to control the growth and differentiation of the human neuroblastoma cell line SK-ER3. *Mol Endocrinol.* 8:910-918.

MacLusky NJ, Lieberburg I, McEwen BS. 1979. The development of estrogen receptor systems in the rat brain: perinatal development. *Brain Res.* 178:129-142.

MacLusky NJ, Naftolin F. 1981. Sexual differentiation of the central nervous system. *Science.* 211:1294-1302.

BIBLIOGRAFÍA

MacLusky NJ, Walters MJ, Clark AS, Toran-Allerand CD. 1994. Aromatase in the cerebral cortex, hippocampus, and mid-brain: ontogeny and developmental implications. *Mol Cell Neurosci.* 5:691-698.

Madeira MD, Andrade JP, Paula-Barbosa MM. 2000. Hypertrophy of the ageing rat medial preoptic nucleus. *J Neurocytol.* 29:173–197.

Maggi A, Ciana P, Belcredito S, Vegeto E. 2004. Estrogens in the nervous system: mechanisms and nonreproductive functions. *Annu. Rev. Physiol.* 66:291-313.

Mannella P, Brinton RD. 2006. Estrogen receptor protein interaction with phosphatidylinositol 3-kinase leads to activation of phosphorylated Akt and extracellular signal-regulated kinase 1/2 in the same population of cortical neurons: a unified mechanism of estrogen action. *J Neurosci.* 26:9439-9447.

Marin R, Guerra B, Alonso R, Ramírez CM, Díaz M. 2005 Estrogen activates classical and alternative mechanisms to orchestrate neuroprotection. *Curr Neurovasc Res.* 2(4):287-301.

Markham JA, Morris JR, Juraska JM. 2007. Neuron number decreases in the rat ventral, but not dorsal, medial prefrontal cortex between adolescence and adulthood. *Neuroscience.* 144:961-968.

Marshall CJ. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell.* 80(2):179-185.

Martínez-Cerdeño V, Noctor SC, Kriegstein AR. 2006. Estradiol stimulates progenitor cell division in the ventricular and subventricular zones of the embryonic neocortex. *Eur J Neurosci.* 24(12):3475-3488.

Matsumoto A. 1991. Synaptogenic action of sex steroids in developing and adult neuroendocrine brain. *Psychoneuroendocrinology.* 16:25-40.

Matsumoto A, Arai Y. 1979. Synaptogenic effect of estrogen on the hypothalamic arcuate nucleus of the adult female rat. *Cell. Tissue Res.* 198:427-433.

Matsumoto A, Arai Y. 1980. Sexual dimorphism in “wiring pattern” in the hypothalamic arcuate nucleus and its modification by neonatal hormonal environment. *Brain Res.* 19:238–242.

Matsumoto A, Arai Y. 1981. Neuronal plasticity in the deafferented hypothalamic arcuate nucleus of adult female rats and its enhancement by treatment with estrogen. *J. Comp. Neurol.* 197:197-205.

Mattson MP, Magnus T. 2006. Ageing and neuronal vulnerability. *Nat. Rev. Neurosci.* 7:278–294.

McCullough LD, Blizzard K, Simpson ER, Oz OK, Hurn PD. 2003. Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection. *J Neurosci.* 23:8701–8705.

McEwen BS. 1996. Gonadal and adrenal steroids regulate neurochemical and structural plasticity of the hippocampus via cellular mechanisms involving NMDA receptors. *Cell Mol. Neurobiol.* 16:103-116.

McEwen BS. 2001. Invited review: Estrogens effects on the brain: multiple sites and molecular mechanisms. *J Appl Physiol.* 91(6):2785-2801.

McEwen B. 2002. Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog. Horm. Res.* 57:357–384.

McInerney EM, Weis KE, Sun J, Mosselman S, Katzenellenbogen BS. 1998. Transcription activation by the human estrogen receptor subtype β (ER β) studied with ER α and ER β receptor chimeras. *Endocrinology* 139, 4513–4522.

Mehra RD, Sharma K, Nyakas C, Vij U. 2005. Estrogen receptor alpha and beta immunoreactive neurons in normal adult and aged female rat hippocampus: a qualitative and quantitative study. *Brain Res.* 1056(1):22-35.

Mendez P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2003. Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res.* 112(1-2):170-176.

Mendez P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM. 2005. Interdependence of oestrogen and insulin-like growth factor-I in the brain: potential for analysing neuroprotective mechanisms. *J. Endocrinol.* 185:11–17.

Mendez P, Wandosell F, Garcia-Segura LM. 2006. Cross-talk between estrogen receptors and insulin-like growth factor-I receptor in the brain: cellular and molecular mechanisms. *Front Neuroendocrinol.* 27:391-403.

BIBLIOGRAFÍA

- Mendez P, Garcia-Segura LM. 2006. Phosphatidylinositol 3-kinase and glycogen synthase kinase 3 regulate estrogen receptor-mediated transcription in neuronal cells. *Endocrinology*. 147(6):3027-3039.
- Mermelstein PG, Becker BJ, Surmeier DJ. 1996. Estradiol reduces calcium currents in rat neostriatal neurons via a membrane receptor. *J. Neurosci.* 16:595–604.
- Merry BJ, Holehan AM. 1996. Retardation by restricted feeding of age-related changes in steroidogenic activity of rat pre- and post-ovulatory follicles. *Age Ageing*. 25(3):250-255.
- Merry DE, Korsmeyer SJ. 1997. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu. Rev. Neurosci.* 20:245-267
- Métivier R, Penot G, Hübner MR, Reid G, Brand H, Kos M, Gannon F. 2003. Estrogen receptor-alpha directs ordered, cyclical, and combinatorial recruitment of cofactors on a natural target promoter. *Cell*. 115(6):751-763.
- Meyer G, Ferres-Torres R, Mas M. 1978. The effects of puberty and castration on hippocampal dendritic spines of mice. A Golgi study. *Brain Res.* 155:108-112.
- Mhyre AJ, Dorsa DM. 2006. Estrogen activates rapid signaling in the brain: role of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in neurons and glia. *Neuroscience*. 138(3):851-858).
- Micevych P, Sinchak K. 2008. Estradiol regulation of progesterone synthesis in the brain. *Mol Cell Endocrinol.* 290(1-2):44-50.
- Micevych PE, Chaban V, Ogi J, Lakhter A, Lu JKH, Sinchak K. 2007. Estradiol stimulates progesterone synthesis in hypothalamic astrocyte cultures. *Endocrinology*. 148:782–789.
- Michels KM, Lee WH, Seltzer A, Saavedra JM, Bondy CA. 1993. Up-regulation of pituitary [125I] insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding and IGF-I gene expression by estrogen. *Endocrinology*. 132:23–29.
- Migliaccio A, Di Domenico M, Castoria G, de Falco A, Bontempo P, Nola E, Auricchio F. 1996. Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* 15(6):1292-1300.
- Miranda RC, Sohrabji F, Toran-Allerand CD. 1993. Neuronal colocalization of mRNAs for neurotrophins and their receptors in the developing central nervous system suggests a potential for autocrine interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90(14):6439-6443.

Miranda RC, Sohrabji F, Toran-Allerand D. 1994. Interactions of estrogen with the neurotrophins and their receptors during neural development. *Horm. Behav.* 28(4):367-375.

Mohamed MK, Abdel-Rahman AA. 2000. Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *Eur J Endocrinol.* 142(3):307-314.

Monteiro SC, Matte C, Bavaresco CS, Netto CA, Wyse ATS. 2005. Vitamins E and C pretreatment prevents ovariectomy-induced memory deficits in water maze. *Neurobiol Learn Mem* 84:192-199.

Moosmann B, Behl C. 1999. The antioxidant neuroprotective effects of estrogens and phenolic compounds are independent from their estrogenic properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:8867-8872.

Morissette M, Al Sweidi S, Callier S, Di Paolo T. 2008. Estrogen and SERM neuroprotection in animal models of Parkinson's disease. *Mol Cell Endocrinol.* 290(1-2):60-69.

Morse JK, Scheff SW, DeKosky ST. 1986. Gonadal steroids influence axon sprouting in the hippocampal dentate gyrus: a sexually dimorphic response. *Exp. Neurol.* 94:649-658.

Morse JK, DeKosky ST, Scheff SW. 1992. Neurotrophic effects of steroids on lesion-induced growth in the hippocampus. II. Hormone Replacement. *Exp. Neurol.* 118:47-52.

Moss RL, Gu Q. 1999. Estrogen: mechanisms for a rapid action in CA1 hippocampal neurons, *Steroids.* 64:14-21.

Mukai H, Takata N, Ishii HT, Tanabe N, Hojo Y, Furukawa A, Kimoto T, Kawato S. 2006. Hippocampal synthesis of estrogens and androgens which are paracrine modulators of synaptic plasticity: synaptocrinology. *Neuroscience.* 138:757-764.

Murphy DD, Segal M. 1997. Morphological plasticity of dendritic spines in central neurons is mediated by activation of cAMP response element binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:1482-1487.

Nadal A, Diaz M, Valverde MA. 2001. The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News Physiol Sci.* 16:251-255.

BIBLIOGRAFÍA

Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z. 1971a. Aromatization of androstenedione by the diencephalon. *J Clin Endocrinol Metab.* 33:368–370.

Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z. 1971b. Aromatization of androstenedione by limbic system tissue from human foetuses. *J Endocrinol.* 51:795–796.

Naftolin F, Ryan KJ, Petro Z. 1972. Aromatization of androstenedione by the anterior hypothalamus of adult male and female rats. *Endocrinology.* 90:295–298.

Naftolin F, Ryan KJ, Davies IJ, Reddy VV, Flores F, Petro Z, Kuhn M, White RJ, Takaoka Y, Wolin L. 1975. The formation of estrogens by central neuroendocrine tissues. *Recent Prog Horm Res.* 31:295-319

Naftolin F. 1994. Brain aromatization of androgens. *J Reprod Med.* 39:257–261.

Naftolin F, Horvath TL, Jakab RL, Leranth C, Harada N, Balthazart J. 1996. Aromatase immunoreactivity in axon terminals of the vertebrate brain. An immunocytochemical study on quail, rat, monkey and human tissues. *Neuroendocrinology.* 63:149-155.

Naftolin F, Garcia-Segura LM, Horvath TL, Zsarnovszky A, Demir N, Fadiel A, Leranth C, Vondracek-Klepper S, Lewis C, Chang A, Parducz A. 2007. Estrogen-induced hypothalamic synaptic plasticity and pituitary sensitization in the control of the estrogen-induced gonadotrophin surge. *Reprod Sci.* 14(2):101-116

Niblock MM, Brunso-Bechtold JK, Riddle DR. 2000. Insulin-like growth factor I stimulates dendritic growth in primary somatosensory cortex. *J Neurosci.* 20:4165-4176.

Nilsen J, Diaz Brinton R. 2003. Mechanism of estrogen-mediated neuroprotection: regulation of mitochondrial calcium and Bcl-2 expression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:2842-2847.

Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson, K, Warner M, Gustafsson JÅ. 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.* 81:1535–1565.

Núñez JL, Lauschke DM, Juraska JM. 2001. Cell death in the development of the posterior cortex in male and female rats. *J Comp Neurol.* 436:32-41.

Núñez JL, Sodhi J, Juraska JM. 2002. Ovarian hormones after postnatal day 20 reduce neuron number in the rat primary visual cortex. *J Neurobiol.* 52:312-321.

O'Kusky JR, Ye P, D'Ercole AJ. 2000. Insulin-like growth factor-I promotes neurogenesis and synaptogenesis in the hippocampal dentate gyrus during postnatal development. *J. Neurosci.* 20:8435–8442.

O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U. 2004. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol. Endocrinol.* 18:1859–1875.

Owens PC, Gill PG, De Young NJ, Weger MA, Knowels SE, Moyse KJ. 1993. Estrogen and progesterone regulate secretion of insulin-like growth factor binding proteins by human breast cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 193:467–473.

Paganini-Hill A. 2001. Hormone replacement therapy and stroke: risk, protection or no effect? *Maturitas.* 38(3):243-261.

Park JJ, Baum MJ, Paredes RG, Tobet SA. 1996. Neurogenesis and cell migration into the sexually dimorphic preoptic area/anterior hypothalamus of the fetal ferret. *J Neurobiol.* 30:315–328.

Patrone C, Gianazza E, Santagati S, Agrati P, Maggi A. 1998. Divergent pathways regulate ligand-independent activation of ER alpha in SK-N-BE neuroblastoma and COS-1 renal carcinoma cells. *Mol Endocrinol.* 12:835-841.

Patrone C, Andersson S, Korhonen L, Lindholm D. 1999. Estrogen receptor-dependent regulation of sensory neuron survival in developing dorsal root ganglion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96(19):10905-10910.

Paxinos G, Watson C. 1998. The rat brain in stereotaxic coordinates. *Fourth Edition. San Diego: Academic Press.*

Peineau S, Taghibiglou C, Bradley C, Wong TP, Liu L, Lu J, Lo E, Wu D, Saule E, Bouschet T, Matthews P, Isaac JT, Bortolotto ZA, Wang YT, Collingridge GL. 2007. LTP inhibits LTD in the hippocampus via regulation of GSK3beta. *Neuron.* 53:703-717.

Perez-Martin M, Azcoitia I, Trejo JL, Sierra A, Garcia-Segura LM. 2003. An antagonist of estrogen receptors blocks the induction of adult neurogenesis by insulin-like growth factor-I in the dentate gyrus of adult female rat. *Eur. J. Neurosci.* 18:923–930.

Peterson RS, Saldanha CJ, Schlinger BA. 2001. Rapid upregulation of aromatase mRNA and protein following neural injury in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *J Neuroendocrinol.* 13:317-323.

BIBLIOGRAFÍA

Peterson RS, Lee DW, Fernando G, Schlinger BA. 2004. Radial glia express aromatase in the injured zebra finch brain. *J Comp Neurol.* 475:261-269.

Peterson RS, Yarram L, Schlinger BA, Saldanha CJ. 2005. Aromatase is presynaptic and sexually dimorphic in the adult zebra finch brain. *Proc Biol Sci.* 272:2089-2096.

Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JÅ. 1997. Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor. *Mol. Endocrinol.* 11:1486–1496.

Pike CJ. 1999. Estrogen modulates neuronal Bcl-xL expression and beta-amyloid-induced apoptosis: relevance to Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 72(4):1552-1563.

Popken GJ, Hodge RD, Ye P, Zhang J, Ng W, O'Kusky JR, D'Ercole AJ. 2004. In vivo effects of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on prenatal and early postnatal development of the central nervous system. *Eur J Neurosci.* 19:2056-2068.

Pozzo-Miller LD, Inoue T, Murphy DD. 1999. Estradiol increases spine density and NMDA-dependent Ca²⁺ transients in spines of CA1 pyramidal neurons from hippocampal slices. *J. Neurophysiol.* 81:1404–1411.

Prange-Kiel J, Jarry H, Schoen M, Kohlmann P, Lohse C, Zhou L, Rune GM. 2008. Gonadotropin-releasing hormone regulates spine density via its regulatory role in hippocampal estrogen synthesis. *J Cell Biol.* 180: 417–426.

Pratt WB, Galignana MD, Morishima Y, Murphy TJM. 2004. Role of molecular chaperons in steroid receptor action. In: McEwan, I.J. (Ed.), *Essays in Biochemistry: The Nuclear Receptor Superfamily.* Portland Press, London, pp. 41–58.

Pugazhenth S, Nesterova A, Sable C, Heidenreich KA, Boxer LM, Heasley LE, Reusch JE. 2000. Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J. Biol. Chem.* 275(15):10761-10766.

Puglielli L. 2008. Aging of the brain, neurotrophin signaling, and Alzheimer's disease: is IGF1-R the common culprit? *Neurobiol Aging.* 29(6):795-781

Qiu J, Bosch MA, Tobias SC, Grandy DK, Scanlan TS, Ronnekleiv OK, Kelly MJ. 2003. Rapid signaling of estrogen in hypothalamic neurons involves a novel G-protein-coupled estrogen receptor that activates protein kinase C. *J. Neurosci.* 23(29):9529-9540.

Quesada A, Lee BY, Micevych PE. 2008. PI3 kinase/Akt activation mediates estrogen and IGF-1 nigral DA neuronal neuroprotection against a unilateral rat model of Parkinson's disease. *Dev Neurobiol.* 68(5):632-644.

Raap DK, DonCarlos L, Garcia F, Muma NA, Wolf WA, Battaglia G, van de Kar LD. 2000. Estrogen desensitizes 5-HT(1A) receptors and reduces levels of G(z), G(i1) and G(i3) proteins in the hypothalamus. *Neuropharmacology.* 39:1823–1832.

Rau SW, Dubal DB, Böttner M, Gerhold LM, Wise PM. 2003. Estradiol attenuates programmed cell death after stroke-like injury. *J Neurosci.* 23(36):11420-11426.

Razandi M, Pedram A, Merchenthaler I, Greene GL, Levin ER. 2004. Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol. Endocrinol.* 18(12):2854-2865.

Reed MG, Howard CV. 1998. Surface-weighted star volume: concept and estimation. *J Microsc.* 190(Pt 3):350-356.

Reid G, Hubner MR, Metivier R, Brand H, Denger S, Manu D, Beaudouin J, Ellenberg J, Gannon F 2003 Cyclic, proteasome-mediated turnover of unliganded and liganded ER_ on responsive promoters is an integral feature of estrogen signaling. *Mol Cell.* 11:695–707.

Reid SN, Juraska JM. 1992. Sex differences in neuron number in the binocular area of the rat visual cortex. *J Comp Neurol.* 321:448-455.

Resnick SM, Maki PM. 2001. Effects of hormone replacement therapy on cognitive and brain aging. *Ann. NY Acad. Sci.* 949:203–214.

Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 307(5715):1625-1630.

Rhees RW, Shryne JE, Gorski RA. 1990. Onset of the hormone-sensitive perinatal period for sexual differentiation of the sexually dimorphic nucleus of the preoptic area in female rats. *J Neurobiol.* 21:781–786.

Ronda AC, Buitrago C, Colicheo A, de Boland AR, Roldán E, Boland R. 2007. Activation of MAPKs by 1alpha,25(OH)2-Vitamin D3 and 17beta-estradiol in skeletal muscle cells leads to phosphorylation of Elk-1 and CREB transcription factors. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 103(3-5):462-466.

BIBLIOGRAFÍA

Roselli CF. 2007. Brain aromatase: roles in reproduction and neuroprotection. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 106:143–150.

Rubin BS, Fox TO, Bridges RS. 1986 Estrogen binding in nuclear and cytosolic extracts from brain and pituitary of middle-aged female rats. *Brain Res.* 383(1-2):60-67

Russell JW, Windebank AJ, Schenone A, Feldman EL. 1998. Insulin-like growth factor-I prevents apoptosis in neurons after nerve growth factor withdrawal. *J. Neurobiol.* 36:455–467.

Saito Y, Vandenheede JR, Cohen P. 1994. The mechanism by which epidermal growth factor inhibits glycogen synthase kinase 3 in A431 cells. *Biochem J.* 303 (Pt 1):27-31.

Sakamoto H, Mezaki Y, Shikimi H, Ukena K, Tsutsui K. 2003. Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell. *Endocrinology.* 144:4466-4477.

Saldanha CJ, Schlinger BA. 1997. Estrogen synthesis and secretion in the brownheaded cowbird (*Molothrus ater*). *Gen Comp Endocrinol.* 105:390-401.

Sanghera MK, Simpson ER, McPhaul MJ, Kozlowski G, Conley AJ, Lephart ED. 1991. Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology.* 129:2834-2844.

Sar M y Welsch F. 1999. Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology.* 140:963–971.

Sastry PS, Rao KS. 2000. Apoptosis and the nervous system. *J. Neurochem.* 74(1):1-20.

Sato T, Teramoto T, Tanaka K, Ohnishi Y, Irifune M, Nishikawa T. 2003. Effects of ovariectomy and calcium deficiency on learning and memory of eight-arm radial maze in middle-aged female rats. *Behav Brain Res* 142: 207–216.

Sawada M, Alkayed NJ, Goto S, Crain BJ, Traystman RJ, Shaivitz A, Nelson RJ, Hurn PD. 2000. Estrogen receptor antagonist ICI182,780 exacerbates ischemic injury in female mouse. *J Cereb Blood Flow Metab.* 20(1):112-118.

Schramek H, Schumacher M, Wilflingseder D, Oberleithner H, Pfaller W. 1997. Differential expression and activation of MAP kinases in dedifferentiated MDCK-focus cells. *Am J Physiol.* 272(2 Pt 1):C383-391.

- Schwarz JM, McCarthy MM. 2008. Cellular mechanisms of estradiol-mediated masculinization of the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 109(3-5):300-306.
- Scrace G, Waterfield M, Chambon P. 1985. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7889–7893.
- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. 2000. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell.* 103(6):843-852
- Sharma K, Mehra RD, Dhar P, Vij U. 2007. Chronic exposure to estrogen and tamoxifen regulates synaptophysin and phosphorylated cAMP response element-binding (CREB) protein expression in CA1 of ovariectomized rat hippocampus. *Brain Res.* 1132(1):10-19.
- Sharma K, Mehra RD. 2008. Long-term administration of estrogen or tamoxifen to ovariectomized rats affords neuroprotection to hippocampal neurons by modulating the expression of Bcl-2 and Bax. *Brain Res.* 14;1204:1-15.
- Sherwin BB. 2002. Estrogen and cognitive aging in women. *Trends Pharmacol Sci.* 23:527–534.
- Shima N, Yamaguchi Y, Yuri K. 2003. Distribution of estrogen receptor beta mRNA-containing cells in ovariectomized and estrogen-treated female rat brain. *Anat Sci Int.* 78(2):85-97
- Shughrue PJ, Merchenthaler I. 2000. Estrogen is more than just a “sex hormone”: novel sites for estrogen action in the hippocampus and cerebral cortex. *Front. Neuroendocrinol.* 21:95–101.
- Shull JD, Gorski J. 1989. Estrogen regulation of prolactin gene transcriptions in vivo: paradoxical effect of 17 beta-estradiol dose. *Endocrinology.* 124(1): 279-285.
- Sierra A, Lavaque E, Perez-Martin M, Azcoitia I, Hales DB, Garcia-Segura LM. 2003.
- Steroidogenic acute regulatory protein in the rat brain: cellular distribution, developmental regulation and overexpression after injury. *Eur J Neurosci.* 18(6):1458-1467.
- Sierra A, Azcoitia I, Garcia-Segura L. 2003. Endogenous estrogen formation is neuroprotective in model of cerebellar ataxia. *Endocrine.* 21:43–51.
- Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK. 2000. Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature.* 407(6803):538-541.

BIBLIOGRAFÍA

Simpkins JW, Green PS, Gridley KE, Singh M, de Fiebre NC, Rajakumar G. 1997. Role of estrogen replacement therapy in memory enhancement and the prevention of neuronal loss associated with Alzheimer's disease. *Am. J. Med.* 103:19S-25S.

Sinchak K, Mills RH, Tao L, LaPolt P, Lu JK, Micevych P. 2003. Estrogen induces de novo progesterone synthesis in astrocytes. *Dev Neurosci.* 25(5):343-348.

Singer CA, Rogers KL, Dorsa DM. 1998. Modulation of Bcl-2 expression: a potential component of estrogen protection in NT2 neurons. *Neuroreport.* 9(11):2565-2568.

Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, Dorsa DM. 1999. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci.* 19(7):2455-2463.

Singh M, Sétáló G Jr, Guan X, Frail DE, Toran-Allerand CD. 2000. Estrogen-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade in the cerebral cortex of estrogen receptor-alpha knock-out mice. *J Neurosci.* 20(5):1694-1700.

Singh M. 2001. Ovarian hormones elicit phosphorylation of Akt and extracellular-signal regulated kinase in explants of the cerebral cortex. *Endocrine.* 14:407-415.

Sisk CL, Zehr JL. 2005. Pubertal hormones organize the adolescent brain and behavior. *Front Neuroendocrinol.* 26:163-174.

Smith CL, O'Malley BW. 2004. Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr. Rev.* 25:45-71.

Smith MS, Freeman ME, Neill JD. 1975. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology.* 96(1):219-226.

Sohrabji F, Greene LA, Miranda RC, Toran-Allerand CD. 1994. Reciprocal regulation of estrogen and NGF receptors by their ligands in PC12 cells. *J. Neurobiol.* 25(8):974-988.

Song RX, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, Santen RJ. 2002. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER α -Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol.* 16:116-127.

Sonntag WE, Ramsey M, Carter CS. 2005. Growth hormone and insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and their influence on cognitive aging. *Ageing Res. Rev.* 4:195–212.

Steinberg L. 2005. Cognitive and affective development in adolescence. *Trends Cogn Sci.* 9:69-74.

Speert DB, Konkle AT, Zup SL, Schwarz JM, Shiroor C, Taylor ME, McCarthy MM. 2007. Focal adhesion kinase and paxillin: novel regulators of brain sexual differentiation? *Endocrinology.* 148(7):3391-3401.

Steinberg L. 2005. Cognitive and affective development in adolescence. *Trends Cogn Sci.* 9:69-74.

Stone DJ, Rozovsky I, Morgan TE, Anderson CP, Finch CE. 1998. Increased synaptic sprouting in response to estrogen via an apolipoprotein E-dependent mechanism: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 18:3180-3185.

Sukovich DA, Mukherjee R, Benfield PA. 1994. A novel, cell-type-specific mechanism for estrogen receptor-mediated gene activation in the absence of an estrogen-responsive element. *Mol Cell Biol.* 14(11):7134-7143.

Sutherland C, Leighton IA, Cohen P. 1993. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J.* 296 (Pt 1):15-19.

Suzuki S, Brown CM, Wise PM. 2006. Mechanisms of neuroprotection by estrogen. *Endocrine.* 29(2):209-215.

Szego EM, Barabás K, Balog J, Szilágyi N, Korach KS, Juhász G, Abrahám IM. 2006. Estrogen induces estrogen receptor alpha-dependent cAMP response element-binding protein phosphorylation via mitogen activated protein kinase pathway in basal forebrain cholinergic neurons in vivo. *J Neurosci.* 12;26(15):4104-4110.

Takadera T, Matsuda I, Ohyashiki T. 1999. Apoptotic cell death and caspase-3 activation induced by N-methyl-D-aspartate receptor antagonists and their prevention by insulin-like growth factor I. *J. Neurochem.* 73:548–556.

Tanapat P, Hastings NB, Gould E. 2005. Ovarian steroids influence cell proliferation in the dentate gyrus of the adult female rat in a dose- and time-dependent manner. *J Comp Neurol.* 481(3):252-265.

BIBLIOGRAFÍA

Tang ED, Nunez G, Barr FG, Guan KL. 1999. Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt. *J Biol Chem*. 274:16741-16746.

Tanzer L, Jones KJ. 1997. Gonadal steroid regulation of hamster facial nerve regeneration: effects of dihydrotestosterone and estradiol. *Exp. Neurol*. 146:58-64.

Tateishi Y, Kawabe Y, Chiba T, Murata S, Ichikawa K, Murayama A, Tanaka K, Baba T, Kato S, Yanagisawa J. 2004. Ligand-dependent switching of ubiquitin-proteasome pathways for estrogen receptor. *EMBO J*. 23(24):4813-4823.

Teter B, Harris-White ME, Frautschy SA, Cole GM. 1999. Role of apolipoprotein E and estrogen in mossy fiber sprouting in hippocampal slice cultures. *Neuroscience*. 91:1009-1016.

Thakur MK, Sharma PK. 2007. Transcription of estrogen receptor alpha and beta in mouse cerebral cortex: effect of age, sex, 17beta-estradiol and testosterone. *Neurochem Int*. 50(2):314-321.

Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. 2005. Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 146(2):624-632.

Thompson PM, Giedd JN, Woods RP, MacDonald D, Evans AC, Toga AW. 2000. Growth patterns in the developing brain detected by using continuum mechanical tensor maps. *Nature*. 404:190-193.

Todd BJ, Fraley GS, Peck AC, Schwartz GJ, Etgen AM. 2007. Central insulin-like growth factor 1 receptors play distinct roles in the control of reproduction, food intake, and body weight in female rats. *Biol Reprod*. 77:492-503.

Toran-Allerand CD. 1976. Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro: implications for sexual differentiation. *Brain Res*. 106: 407-412.

Toran-Allerand CD. 1980. Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro. II. Morphological correlates and hormonal specificity. *Brain Res*. 189:413-427.

Toran-Allerand CD, Hashimoto K, Greenough WT, Saltarelli M. 1983. Sex steroids and the development of the newborn mouse hypothalamus and preoptic area in vitro. III. Effects of estrogen on dendritic differentiation. *Brain Res*. 283:97-101.

Toran-Allerand CD, Miranda RC, Bentham WD, Sohrabji F, Brown TJ, Hochberg RB, MacLusky NJ. 1992. Estrogen receptors colocalize with low-affinity nerve growth factor receptors in cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 89(10):4668-4672.

Toran-Allerand CD. 1996. The estrogen/neurotrophin connection during neural development: is co-localization of estrogen receptors with the neurotrophins and their receptors biologically relevant? *Dev. Neurosci*. 18(1-2):36-48.

Toran-Allerand CD, Singh M, Sétáló G. 1999. Novel mechanisms of estrogen action in the brain: new players in an old story. *Front. Neuroendocrinol*. 20:97-121.

Toran-Allerand CD. 2005. Estrogen and the brain: beyond ER-alpha, ER-beta, and 17beta-estradiol. *Ann N Y Acad Sci*. 1052:136-144.

Trejo JL, Carro E, Lopez-Lopez C, Torres-Aleman I. 2004. Role of serum insulin-like growth factor I in mammalian brain aging. *Growth Horm IGF Res. Suppl A*:S39-43.

Tripanichkul W, Sripanichkulchai K, Duce JA, Finkelstein DI. 2007. 17Beta-estradiol reduces nitrotyrosine immunoreactivity and increases SOD1 and SOD2 immunoreactivity in nigral neurons in male mice following MPTP insult. *Brain Res*. 1164:24-31.

Tsai HY, Lin HY, Fong YC, Wu JB, Chen YF, Tsuzuki M, Tang CH. 2008. Paeonol inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis by inhibiting ERK, p38 and NF-kappaB pathway. *Eur J Pharmacol*. 588(1):124-133.

Turgeon JL, McDonnell DP, Martin KA, Wise PM. 2004. Hormone therapy: physiological complexity belies therapeutic simplicity. *Science*. 304(5675):1269-1273.

Van Golen CM, Feldman EL. 2000. Insulin-like growth factor I is the key growth factor in serum that protects neuroblastoma cells from hyperosmotic-induced apoptosis. *J. Cell Physiol*. 182:24-32.

Vantaggiato C, Formentini I, Bondanza A, Bonini C, Naldini L, Brambilla R. 2006. ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases affect Ras-dependent cell signaling differentially. *J Biol*. 5:14.

Vasudevan N, Kow LM, Pfaff D. 2005. Integration of steroid hormone initiated membrane action to genomic function in the brain. *Steroids*. 70(5-7):388-396.

BIBLIOGRAFÍA

Vida B, Hrabovszky E, Kalamatianos T, Coen CW, Liposits Z, Kalló I. 2008. Oestrogen receptor alpha and beta immunoreactive cells in the suprachiasmatic nucleus of mice: distribution, sex differences and regulation by gonadal hormones. *Neuroendocrinol.* 20(11):1270-7. PMID: 18752649

Wade CB, Dorsa DM. 2003. Estrogen activation of cyclic adenosine 5'- monophosphate response element-mediated transcription requires the extracellularly regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology.* 144: 832-838.

Walter P, Green S, Greene G, Krust A, Bornert JM, Jeltsch JM, Staub A, Jensen E, Scrace G, Waterfield M, Chambon P. 1985. Cloning of the human estrogen receptor cDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:7889-7893.

Wang L, Andersson S, Warner M, Gustafsson JA. 2003. Estrogen receptor (ER)beta knockout mice reveal a role for ERbeta in migration of cortical neurons in the developing brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:703-708.

Wehrenberg U, Prange-Kiel J, Rune GM. 2001. Steroidogenic factor-1 expression in marmoset and rat hippocampus: co-localization with StAR and aromatase. *J Neurochem.* 76:1879-1886.

Weiland NG, Orikasa C, Hayashi S, McEwen BS. 1997. Distribution and hormone regulation of estrogen receptor immunoreactive cells in the hippocampus of male and female rats. *J Comp Neurol.* 388:603-612.

Wilson ME, Liu Y, Wise PM. 2002. Estradiol enhances Akt activation in cortical explant cultures following neuronal injury. *Brain Res Mol Brain Res.* 102:48-54.

Wise PM, Camp P. 1984. Changes in concentrations of estradiol nuclear receptors in the preoptic area, medial basal hypothalamus, amygdala, and pituitary gland of middle-aged and old cycling rats. *Endocrinology.* 114(1):92-98

Wise PM, Dubal DB, Wilson ME, Rau SW. 2000. Estradiol is a neuroprotective factor in in vivo and in vitro models of brain injury. *J. Neurocytol.* 29 (5-6):401-410.

Wood JR, Likhite VS, Loven MA, Nardulli AM. 2001. Allosteric modulation of estrogen receptor conformation by different estrogen response elements. *Mol. Endocrinol.* 15:1114-1126.

Woolley CS, McEwen BS. 1992. Estradiol mediates fluctuation in hippocampal synapse density during the estrous cycle in the adult rat. *J Neurosci.* 12:2549-2554.

- Woolley CS. 1998. Estrogen-mediated structural and functional synaptic plasticity in the female rat hippocampus. *Horm. Behav.* 34:140-148.
- Woolley CS. 2007. Acute effects of estrogen on neuronal physiology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 47:657-680.
- Wu CH, Liu JY, Wu JP, Hsieh YH, Liu CJ, Hwang JM, Lee SD, Chen LM, Chang MH, Kuo WW, Shyu JC, Tsai JH, Huang CY. 2005. 17beta-estradiol reduces cardiac hypertrophy mediated through the up-regulation of PI3K/Akt and the suppression of calcineurin/NF-AT3 signaling pathways in rats. *Life Sci.* 78(4):347-356.
- Yague JG, Muñoz A, de Monasterio-Schrader P, Defelipe J, Garcia-Segura LM, Azcoitia I. 2006. Aromatase expression in the human temporal cortex. *Neuroscience.* 138(2):389-401
- Yamaguchi-Shima N, Yuri K. 2007. Age-related changes in the expression of ER-beta mRNA in the female rat brain. *Brain Res.* 1155:34-41
- Yao M, Nguyen TV, Pike CJ. 2007. Estrogen regulates Bcl-w and Bim expression: role in protection against beta-amyloid peptide-induced neuronal death. *J Neurosci.* 27:1422-1433.
- Ye L, Leung LK. 2008. Effect of dioxin exposure on aromatase expression in ovariectomized rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 229(1):102-108.
- Ye P, Xing Y, Dai Z, D'Ercole AJ. 1996. In vivo actions of insulin-like growth factor-I (IGF-I) on cerebellum development in transgenic mice: evidence that IGF-I increases proliferation of granule cell progenitors. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 95:44-54.
- Yi KD, Chung J, Pang P, Simpkins JW. 2005. Role of protein phosphatases in estrogen-mediated neuroprotection. *J Neurosci.* 25(31):7191-7198.
- Yi KD, Cai ZY, Covey DF, Simpkins JW. 2008. Estrogen receptor-independent neuroprotection via protein phosphatase preservation and attenuation of persistent extracellular signal-regulated kinase 1/2 activation. *J Pharmacol Exp Ther.* 324(3):1188-1195.
- Yu X, Rajala RV, McGinnis JF, Li F, Anderson RE, Yan X, Li S, Elias RV, Knapp RR, Zhou X, Cao W. 2004. Involvement of insulin/phosphoinositide 3-kinase/Akt signal pathway in 17 beta-estradiol-mediated neuroprotection. *J Biol Chem.* 279:13086-13094.
- Zecevic N, Rakic P. 1991. Synaptogenesis in monkey somatosensory cortex. *Cereb Cortex.* 1:510-523.

BIBLIOGRAFÍA

Zhang L, Rubinow DR, Xaing G, Li BS, Chang YH, Maric D, Barker JL, Ma W. 2001. Estrogen protects against beta-amyloid-induced neurotoxicity in rat hippocampal neurons by activation of Akt. *NeuroReport*. 12:1919-1923.

Zhang Y, Tounekti O, Akerman B, Goodyer CG, LeBlanc A. 2001. 17-beta-estradiol induces an inhibitor of active caspases. *J. Neurosci*. 21(20):RC176.

Zhang Y, Bhavnani BR. 2005. Glutamate-induced apoptosis in primary cortical neurons is inhibited by equine estrogens via down-regulation of caspase-3 and prevention of mitochondrial cytochrome c release. *BMC. Neurosci*. 6(1):13.

Zhao H, Tian Z, Hao J, Chen B. 2005. Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reprod Biol Endocrinol*. 21:3-6.

Zhao L, Wu TW, Brinton RD. 2004. Estrogen receptor subtypes alpha and beta contribute to neuroprotection and increased Bcl-2 expression in primary hippocampal neurons. *Brain Res*. 1010:22-34.

Zhao L, Brinton RD. 2007. Estrogen receptor alpha and beta differentially regulate intracellular Ca(2+) dynamics leading to ERK phosphorylation and estrogen neuroprotection in hippocampal neurons. *Brain Res*. 1172:48-59.

Zhou Y, Watters JJ, Dorsa DM. 1996. Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinology*. 137:2163–2166.

Zhou FQ, Zhou J, Dedhar S, Wu YH, Snider WD. 2004. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron*. 42:897-912.

Zhu JL, Yang GL, Huang YM. 2004. Effect of soybean isoflavone on the cognitive function in ovariectomized mice. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 29:81–3.

Zhu TS, Glaser M. 2008. Neuroprotection and enhancement of remyelination by estradiol and dexamethasone in cocultures of rat DRG neurons and Schwann cells. *Brain Res*. 1206:20-32.

Znamensky V, Akama KT, McEwen BS, Milner TA. 2003. Estrogen levels regulate the subcellular distribution of phosphorylated Akt in hippocampal CA1 dendrites. *J Neurosci*. 23:2340-2347.

BIBLIOGRAFÍA

Zwain IH, Yen SS, Cheng CY. 1997. Astrocytes cultured in vitro produce estradiol-17beta and express aromatase cytochrome P-450 (P-450 AROM) mRNA. *Biochim Biophys Acta*. 1334(2-3):338-348.

Zwain IH, Yen SS. 1999. Neurosteroidogenesis in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons of cerebral cortex of rat brain. *Endocrinology*. 140:3843-3852.